

N°d'ordre : **2467**

## **THESE**

présentée

pour obtenir

**LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE**

École doctorale : Transferts, Dynamique des Fluides, Energie et Procédés

Spécialité : Sciences des Agroressources

Par **Melle Amélie LHUILLIER**

**CONTRIBUTION A L'ETUDE PHYTOCHIMIQUE  
DE QUATRE PLANTES MALGACHES :  
*AGAURIA SALICIFOLIA* HOOK.F EX OLIVER, *AGAURIA POLYPHYLLA*  
BAKER (*ERICACEAE*), *TAMBOURISSA TRICHOPHYLLA* BAKER  
(*MONIMIACEAE*) ET *EMBELIA CONCINNA* BAKER (*MYRSINACEAE*)**

**Soutenue le 20 avril 2007 devant le jury composé de :**

M.	Antoine GASET	Président
M.	Salvador CAÑIGUERAL	Rapporteur
M.	Bernard BODO	Rapporteur
Mme	Isabelle FOURASTÉ	Directeur de thèse
M.	Claude MOULIS	Directeur de thèse
M.	Kurt HOSTETTMANN	Membre

*A Domie...*

*A mes parents et à mes frères Pierre-Emile, Louis et Vincent*

*A mon mari Alex*

*A mes amis et à tous les membres de ma famille*

## **Remerciements**

J'ai eu la chance et le plaisir d'effectuer ce travail de recherche dans le Laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie de Toulouse (UMR 152 IRD UPS - Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox) sous la direction respective des professeurs Isabelle Fourasté et Claude Moulis.

Tout d'abord, je tiens particulièrement à remercier Madame le Professeur Isabelle Fourasté pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Pharmacognosie, pour m'avoir fait confiance, m'avoir encouragé et conseillé tout en me laissant une grande liberté. Pour son soutien et sa grande générosité, qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude.

Je remercie sincèrement Monsieur le professeur Claude Moulis, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour m'avoir accordé sa confiance que pour m'avoir guidé dans mon travail tout au long de ces années. Ses conseils et ses commentaires mais aussi sa bienveillance et son humour auront été fort utiles.

- - -

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur Antoine Gaset de l'ENSIACET de Toulouse d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance de thèse.

J'aimerais également remercier Monsieur le Professeur Bernard Bodo du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris ainsi que Monsieur le Professeur Salvador Cañigual de la Faculté de Pharmacie de Barcelone pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, pour avoir accepté d'en être rapporteurs et surtout pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. J'ai apprécié notre interaction et leurs remarques avisées lors de ma soutenance de thèse.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur le Professeur Kurt Hostettmann de l'Université de Lausanne pour avoir accepté de juger ce travail.

- - -

Cette thèse est le fruit d'une collaboration avec la division SERDEX des Laboratoires Bayer Consumer Care. Je tiens donc à remercier Monsieur Gérard Sené pour la confiance qu'il m'a accordée en me confiant ce travail.

Mes remerciements vont également à Alain Loiseau pour son aide et pour les discussions enrichissantes qui ont contribué à ce travail, ainsi qu'à Eric, Virginie, Caroline et tous les autres membres de l'équipe pour m'avoir très fortement soutenu et impliqué dans leurs projets. Malgré l'éloignement géographique, je me suis toujours sentie intégrée à l'équipe R & D.

- - -

Je remercie tous ceux sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est : aussi bien par les discussions que j'ai eu la chance d'avoir avec eux, leurs suggestions ou contributions.

Un très grand merci à Nicolas Fabre qui a joué un rôle fondamental dans ma formation. Tout au long de ces trois années, il a su m'aider à orienter mes recherches. Je le remercie pour son amitié, son aide, sa confiance et ses conseils si précieux tout le long de mon travail de thèse.

J'adresse de sincères remerciements à Monsieur le Professeur Edouard Stanislas pour sa bienveillance et sa gentillesse et ses encouragements.

Mes plus vifs remerciements à pour leur accueil et leur disponibilité à Cathy Claparols et Nathalie Martins du service commun de spectrométrie de masse de l'UPS de Toulouse.

Merci aussi à tous mes collègues et amis du laboratoire : ceux « d'en haut » Valérie et Fahtia, Lucia, Séverine, Alexis et Valérie...et les autres, et tous ceux « d'en bas » Florence, Mohamed, Bénédicte, Vincent, ... sans oublier mes super stagiaires Florian et Eloïse ! Merci à tous pour leur amitié et pour leur aide précieuse.

Je tiens enfin à redire le plaisir que j'ai eu à travailler au sein de l'UMR 152, et j'en remercie ici tous les membres.

- - -

Enfin, pour leur soutien sans faille et permanent, je tiens à remercier de tout cœur mes parents, mes frères et mes grands-parents ainsi qu'Alex pour son amour et sa compréhension.

## Abréviations et symboles

Les abréviations ont généralement été indiquées sous la forme la plus couramment utilisée dans la littérature, elles sont donc souvent issues de terminologie anglo-saxonne.

<b>(1), (2), (3),...</b>	: désignation des composés mentionnés dans la partie bibliographique
<b>1-1, 1-2, ...</b>	: désignation des composés identifiées par LC-MS dans <i>Agauria polyphylla</i>
<b>2-1, 2-2, ...</b>	: désignation des composés identifiées par LC-MS dans <i>Agauria salicifolia</i>
<b>[<math>\alpha</math>]<sub>D</sub></b>	: pouvoir rotatoire
<b>A, B, C,...</b>	: désignation des composés naturels isolés dans le présent travail
<b>AcOEt</b>	: acétate d'éthyle
<b>APCI</b>	: ionisation chimique à pression atmosphérique ( <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> )
<b>APG</b>	: <i>Angiosperm Phylogeny Group</i>
<b>APY</b>	: <i>Agauria polyphylla</i> Baker
<b>Ara</b>	: arabinose
<b>ASA</b>	: <i>Agauria salicifolia</i> Hook.f. ex Oliver
<b>br s</b>	: singulet élargi ( <i>broad singulet</i> )
<b>CC</b>	: Chromatographie sur Colonne ouverte
<b>CCM</b>	: Chromatographie sur Couche Mince
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	: chloroforme deutérié
<b>c-Hex</b>	: cyclohexane
<b>CI</b>	: ionisation chimique ( <i>Chemical Ionisation</i> )
<b>CID</b>	: dissociation induite par collision ( <i>Collision Induced Dissociation</i> )
<b>COSY</b>	: <i>CORrelated SpectroscopY</i>
<b>CPC</b>	: Chromatographie de Partage Centrifuge
<b><math>\delta_C</math></b>	: déplacement chimique du carbone (en ppm)
<b><math>\delta_H</math></b>	: déplacement chimique du proton (en ppm)
<b>d</b>	: doublet
<b>Da</b>	: Dalton (unité de masse moléculaire)
<b>DCI</b>	: ionisation chimique par désorption ( <i>Desorption Chemical Ionisation</i> )
<b>DCM</b>	: dichlorométhane
<b>dd</b>	: doublet dédoublé
<b>ddd</b>	: doublet dédoublé dédoublé
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	: diméthylsulfoxyde deutérié
<b>ECC</b>	: <i>Embelia concinna</i> Baker
<b>EDL</b>	: Equivalent de Double Liaison
<b>EI</b>	: ionisation par impact électronique ( <i>Electron Impact ionization</i> )
<b>ESI</b>	: ionisation par électrospray ( <i>ElectroSpray Ionization</i> )
<b>EtOH</b>	: éthanol

FAB	: ionisation par bombardement d'atomes rapides ( <i>Fast Atom Bombardment</i> )
FD	: désorption de champ ( <i>Field Desorption</i> )
Gal	: galactose
GC-MS	: chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ( <i>Gaz Chromatography-Mass Spectrometry</i> )
Glc	: glucose
Gluc	: glucuronide
IT	: spectromètre à trappe d'ions ( <i>Ion trap</i> )
H <sub>2</sub> O	: eau distillée
HCCl <sub>3</sub>	: chloroforme
Hex	: hexane
HMBC	: <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	: chromatographie liquide à haute performance ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HSQC	: <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	: Hertz
<i>J</i>	: constante de couplage
LC-MS	: chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectroscopie de masse ( <i>Liquid chromatography-Mass spectrometry</i> )
LDL	: ( <i>Low Density Lipoprotein</i> )
<i>m</i>	: multiplet
<i>m/z</i>	: masse / charge atomique
MeCN	: acétonitrile
MeOH	: méthanol
MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub>	: méthanol tétradeutérié (RMN)
MPLC	: chromatographie liquide à moyenne pression ( <i>Medium Pressure Liquid Chromatography</i> )
MS	: spectrométrie de masse ( <i>Mass Spectroscopy</i> )
NOESY	: <i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
ppm	: partie par million
<i>q</i>	: quintuplet
q.s.p.	: quantité suffisante pour
Q-TOF	: spectromètre hybride quadripôles-temps de vol ( <i>Quadrupole-Time of flight</i> )
RDA	: Rétro Diels-Alder
R <sub>f</sub>	: rapport frontal (CCM)
Rha	: rhamnose
RMN	: résonance magnétique nucléaire
RMN- <sup>13</sup> H ( <i>J</i> mod)	: résonance magnétique nucléaire du carbone (en mode <i>J</i> modulé)
RMN- <sup>1</sup> H	: résonance magnétique nucléaire du proton
ROS	: dérivés réactifs de l'oxygène ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<i>s</i>	: singulet
semi-prep.	: semi-préparative (HPLC)

sh	: <i>shoulder</i> , désigne un épaulement sur un pic
SiO <sub>2</sub>	: silice
spp	: espèces
<i>t</i>	: triplet
TQ	: spectromètre à Triple Quadripôles
Tol	: toluène
t <sub>R</sub>	: temps de rétention
TTI	: <i>Tambourissa trichophylla</i> Baker
u	: unité de masse atomique
UV	: ultraviolet
UV(DAD)	: détecteur ultraviolet à barrettes de diodes ( <i>Diode Array Detector</i> )
V/V	: rapport volume / volume
Xyl	: xylose





# Table des matières

<b>Abréviations</b>	i
<b>Table des matières</b>	v
<b>Introduction</b>	1
<b>I. SELECTION DES PLANTES DE L'ETUDE</b>	<b>4</b>
<b>1. Critères de sélection des plantes</b>	<b>5</b>
1.1. Une origine géographique commune : Madagascar	5
Les atouts de Madagascar.	5
Des ressources à préserver.	5
1.2. Utilisation des plantes en médecine traditionnelle	7
1.3. Aspects botaniques et chimiotaxonomiques	8
1.4. Les apports de la littérature	8
<b>2. Sélection des extraits : criblage biologique</b>	<b>9</b>
<b>II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>11</b>
<b>1. Présentation de <i>Tambourissa trichophylla</i> Baker (<i>Monimiaceae</i>)</b>	<b>12</b>
1.1. La famille des <i>Monimiaceae</i> Juss.	12
Position systématique.	12
Caractéristiques botaniques des <i>Monimiaceae</i> .	14
Utilisations traditionnelles des <i>Monimiaceae</i> .	14
1.2. Genre <i>Tambourissa</i> Sonn. et <i>T. trichophylla</i> Baker	15
1.3. Principaux métabolites secondaires des <i>Monimiaceae</i>	18
Alcaloïdes.	18
Huiles essentielles.	19
Flavonoïdes.	20
Polyphénols au sens large.	20
1.4. Travaux antérieurs sur le genre <i>Tambourissa</i>	21
<b>2. Présentation d'<i>Agauria salicifolia</i> Hook.f. ex Oliver et <i>Agauria polyphylla</i> Baker (<i>Ericaceae</i>)</b>	<b>22</b>
2.1. La famille des <i>Ericaceae</i> Juss.	22
Position systématique.	22
Caractéristiques botaniques des <i>Ericaceae</i> .	23
Utilisations traditionnelles des <i>Ericaceae</i> .	24
2.2. Genre <i>Agauria</i> Benth. & Hook.f.	25
2.3. Principaux métabolites secondaires des <i>Ericaceae</i> Juss.	28
Tanins.	28
Flavonoïdes.	28
Autres dérivés phénols et hétérosides phénoliques.	28
Huiles essentielles.	29
Diterpènes toxiques.	30
Triterpènes.	31
2.4. Travaux antérieurs sur le genre <i>Agauria</i>	32
<b>3. Présentation d'<i>Embelia concinna</i> Baker (<i>Myrsinaceae</i>)</b>	<b>34</b>
3.1. La famille des <i>Myrsinaceae</i> R. Brown	34

Position systématique.	34
Caractéristiques botaniques des <i>Myrsinaceae</i> .	34
Utilisations traditionnelles des <i>Myrsinaceae</i> .	35
3.2. Genre <i>Embelia</i> Burm. f. et <i>E. concinna</i> Baker	36
3.3. Principaux métabolites secondaires des <i>Myrsinaceae</i>	38
Benzoquinones.	38
Saponosides triterpéniques et triterpènes sensu stricto.	38
Autres substances.	39
3.4. Travaux antérieurs sur le genre <i>Embelia</i>	41
<b>4. Flavonoïdes et spectrométrie de masse</b>	<b>43</b>
4.1. Généralités sur les flavonoïdes	43
Chimie des flavonoïdes.	43
Biosynthèse des flavonoïdes.	43
Classes de flavonoïdes.	44
Distribution dans les plantes et le règne végétal.	45
Rôle dans les plantes.	46
Importance dans l'alimentation.	46
Propriétés chimiques et activités biologiques.	46
4.2. Analyse structurale des flavonoïdes par spectrométrie de masse	49
4.2.1. Les différentes techniques d'ionisation en spectrométrie de masse	49
4.2.2. Le couplage chromatographie-spectrométrie de masse	50
4.2.3. Eléments d'identification des flavonoïdes par spectrométrie de masse	50
4.2.3.1. Etude des génines de flavonoïdes par MS	51
Fragmentation de la génine en mode positif.	52
Fragmentation de la génine en mode négatif	54
Flavonoïdes méthoxylés et autres substituants.	56
4.2.3.2. Apports de la MS à l'étude des flavonoïdes O-glycosylés	57
Clivage hétérolytique : formation des ions $Y_n$ .	57
Clivage homolytique : formation du radical $Y_0^\bullet$ .	57
Position de la liaison osidique sur la génine.	58
Flavonoïdes di-O-glycosylés et O-diglycosylés.	59
Flavonoïdes di-, tri-, tetra-glucosylés.	61
Identification du sucre terminal.	61
4.2.4. Conclusion	61
<b>III. RESULTATS</b>	<b>62</b>
<b>1. Screening chimique général préliminaire par CCM</b>	<b>63</b>
1.1. Interprétation des CCM préliminaires de <i>Agauria salicifolia</i> et <i>Agauria polyphylla</i>	63
1.2. Interprétation des CCM préliminaires de <i>Tambourissa trichophylla</i>	66
1.3. Interprétation des CCM préliminaires de <i>Embelia concinna</i>	66
<b>2. Etude phytochimique des feuilles d'<i>Agauria polyphylla</i> (APY) et d'<i>Agauria salicifolia</i> (ASA)</b>	<b>67</b>
2.1. <i>Agauria polyphylla</i> (APY)	67
2.1.1. Travaux préliminaires au fractionnement	67
2.1.2. Fractionnement de l'extrait APY F <sub>3</sub> et isolement des composés <b>A</b> à <b>C</b>	67
2.2. Fractionnement de l'extrait APY F <sub>2</sub> et isolement du composé <b>C</b>	70
2.2.1. Détermination de structure des composés <b>A</b> , <b>B</b> et <b>C</b> d' <i>Agauria polyphylla</i>	72
2.2.1.1. Détermination de structure du composé <b>A</b>	72

2.2.1.2. Détermination de structure du composé <b>B</b>	76
2.2.1.3. Détermination de structure du composé <b>C</b>	80
2.3. <i>Agauria salicifolia</i> (ASA)	84
2.3.1. Fractionnement de l'extrait ASA F <sub>1</sub> et isolement du composé <b>D</b>	85
2.3.2. Détermination de structure du composé <b>D</b> d' <i>Agauria salicifolia</i>	86
2.4. Comparaison des fractions flavonoïdiques d'ASA et d'APY par LC-MS	89
2.4.1. Obtention des fractions flavonoïdiques : séparation des tanins condensés par précipitation	89
2.4.2. LC-MS comparée des fractions flavonoïdiques de ASA et APY	91
2.4.2.1. Profil HPLC des deux fractions flavonoïdiques.	91
2.4.2.2. Identification des composés des fractions flavonoïdiques par LC-MS.	92
2.4.3. Conclusion	96
2.5. Conclusions de l'étude phytochimique d' <i>Agauria salicifolia</i> et <i>Agauria polyphylla</i>	96
<b>3. Etude phytochimique des feuilles de <i>Tambourissa trichophylla</i> (TTI)</b>	<b>98</b>
3.1. Fractionnement de l'extrait TTI F <sub>3</sub> et isolement des composés <b>E</b> , <b>F</b> et <b>G</b>	98
3.1.1. Détermination de structures des composés <b>E</b> , <b>F</b> et <b>G</b> de <i>Tambourissa trichophylla</i>	99
3.1.1.1. Détermination de structure du composé <b>E</b>	99
3.1.1.2. Détermination de structure du composé <b>F</b>	104
3.1.1.3. Détermination de structure du composé <b>G</b>	107
3.1.2. Fractionnement du lot pilote TTI PL002 et isolement du composé <b>H</b>	108
3.1.3. Détermination de structure du composé <b>H</b> de <i>Tambourissa trichophylla</i>	109
3.2. Conclusion de l'étude phytochimique de <i>Tambourissa trichophylla</i>	112
3.3. Méthode analytique de TTI	112
<b>4. Etude phytochimique des feuilles d'<i>Embelia concinna</i> (ECC)</b>	<b>114</b>
4.1. Fractionnement de l'extrait ECC F <sub>3</sub> et isolement des composés <b>I</b> à <b>S</b>	114
4.2. Détermination de structures des composés <b>I</b> à <b>L</b> isolés des sous-fractions apolaires de ECC F <sub>3</sub>	118
4.2.1. Détermination de structure du composé <b>I</b>	118
4.2.2. Détermination de structure du composé <b>J</b>	123
4.2.3. Détermination de structure du composé <b>K</b>	128
4.3. Détermination de structures des composés <b>L</b> et <b>M</b> par LC-MS.	130
4.4. Détermination de structure du composé <b>N</b>	133
4.5. Détermination de structures des composés <b>O</b> à <b>R</b> isolés des sous-fractions polaires de ECC F <sub>3</sub>	135
4.5.1. Détermination de structure du composé <b>O</b>	135
4.5.2. Détermination de structure du composé <b>P</b>	137
4.5.3. Détermination de structure du composé <b>Q</b>	140
4.5.4. Détermination de structure du composé <b>R</b>	142
4.6. Conclusion de l'étude phytochimique de <i>Embelia concinna</i>	144
<b>IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	<b>145</b>
<b>V. MATERIELS ET METHODES</b>	<b>150</b>
1. Matériel végétal et extraction	151
2. Méthodes chromatographiques analytiques	152
2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	152
Réactif à la Vanilline sulfurique (Révélateur polyvalent).	153
Réactif de Neu ou NP/PEG (Révélateur des flavonoïdes).	153
Réactif de Dragendorff (Révélateur d'alkaloïdes).	153

Réactif au Thymol sulfurique (Réactif des sucres).	153
Réactif au sel de Bleu solide B (pour la détection des phénols et des tanins).	153
Réactif de Liebermann et Burchard (Réactif des stérols, stéroïdes et triterpènes).	153
2.2. Chromatographie liquide haute performance (HPLC/DAD-UV)	154
2.3. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)	154
<b>3. Méthodes chromatographiques préparatives</b>	<b>155</b>
3.1. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)	155
3.2. Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC)	155
3.3. Chromatographie sur cartouches de silice C18 (VAC ELUT®)	155
3.4. Chromatographie préparative sur couche mince	156
3.5. Chromatographie de partage centrifuge (CPC)	156
3.6. Chromatographie liquide haute performance semi-préparative (HPLC semi-prép.)	156
<b>4. Méthodes physico-chimiques</b>	<b>157</b>
4.1. Pouvoir rotatoire	157
4.2. Spectrométrie Ultraviolet (UV)	157
4.3. Spectrométrie Infra-rouge (IR)	157
4.4. Spectrométrie de masse (MS)	157
4.5. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	158
 <b>VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	 <b>159</b>
 <b>VII. ANNEXES</b>	 <b>172</b>
<i>Constantes physiques et données spectrales des composés isolés</i>	<b>173</b>
<i>Publication et poster</i>	<b>190</b>
<i>Lexique de botanique</i>	<b>200</b>

## Introduction

Au travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base : nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux. L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l'homme est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité.

Bien qu'une grande partie du XX<sup>ème</sup> siècle ait été consacrée à la mise au point de molécules de synthèse, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs via le screening de sources naturelles a résulté dans la découverte d'un grand nombre de médicaments utiles qui commencent à jouer un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines [Gurib-Fakim, 2006].

Dan le monde, 80% des populations ont recours à des plantes médicinales pour se soigner, par manque d'accès aux médicaments prescrits par la médecine moderne mais aussi parce que ces plantes ont souvent une réelle efficacité. Aujourd'hui, le savoir des tradipraticiens est de moins en moins transmis et tend à disparaître. C'est pour cela que l'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie s'emploient à recenser, partout dans le monde, des plantes réputées actives et dont il appartient à la recherche moderne de préciser les propriétés et valider les usages [Pelt, 2001]. La recherche de nouvelles molécules doit être entreprise au sein de la biodiversité végétale en se servant de données ethnopharmacologiques. Cette approche permet de sélectionner des plantes potentiellement actives et d'augmenter significativement le nombre de découvertes de nouveaux actifs.

Madagascar dispose d'une grande diversité floristique à laquelle s'ajoute une tradition séculaire d'utilisation traditionnelle des plantes. S'appuyant sur ces deux aspects, la société Serdex, division du groupe Bayer Health Care Consumer Care développe, fabrique et commercialise des extraits de plantes actives provenant pour l'essentiel de Madagascar, ciblés pour les industries pharmaceutiques et cosmétiques.

Ce travail, fruit d'une collaboration entre Serdex et le Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox (UMR-152) de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse, s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouveaux composés qui peuvent trouver une application thérapeutique ou cosmétique.

Ce mémoire est consacré à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches, *Agauria salicifolia* Hook.f. ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker, *Tambourissa trichophylla* Baker et *Embelia concinna* Baker issues du screening de plantes traditionnellement utilisées à Madagascar.

Le but de cette étude consiste à renforcer la connaissance phytochimique de ces extraits de plantes et à mettre en évidence de traceurs spécifiques pour chacune des plantes en vue de l'utilisation ultérieure de leurs extraits dans l'industrie.

Dans un premier chapitre, nous aborderons les différents critères, de l'utilisation en médecine traditionnelle au criblage biologique, qui ont conduit et orienté le choix des plantes de cette étude.

L'état des connaissances bibliographiques botaniques et phytochimiques sur ces quatre plantes et leurs familles botaniques respectives sera présenté dans un second chapitre. Nous développerons également l'utilisation de la spectrométrie de masse comme outil d'analyse pour l'identification de composés naturels fréquemment utilisés comme traceurs dans les préparations à base de plantes : les flavonoïdes.

Le troisième chapitre sera consacré aux résultats de l'étude phytochimique de *Agauria salicifolia* Hook.f. ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker, *Tambourissa trichophylla* Baker et *Embelia concinna* Baker. Pour chaque plante, nous détaillerons les étapes de fractionnement et décrirons l'identification de composés isolés. Nous présenterons également l'application de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS et LC-MS<sup>n</sup>) à la comparaison phytochimique des plantes *Agauria salicifolia* Hook.f. ex Oliver et *Agauria polyphylla* Baker. Enfin, nous utiliserons tous ces résultats pour définir quels traceurs employer pour les extraits de ces plantes

## **1. SELECTION DES PLANTES DE L'ETUDE**





## 1. Critères de sélection des plantes

Afin d'isoler des substances nouvelles de plantes et de trouver de ce fait de nouvelles voies d'applications tant dans les domaines de la pharmacie que de la cosmétique et afin de rendre la stratégie d'isolement le plus efficace, il convient de sélectionner avec soin les plantes à étudier.

Dans cette optique, un certain nombre de critères ont été pris en compte pour sélectionner les plantes de cette étude.

### 1.1. Une origine géographique commune : Madagascar

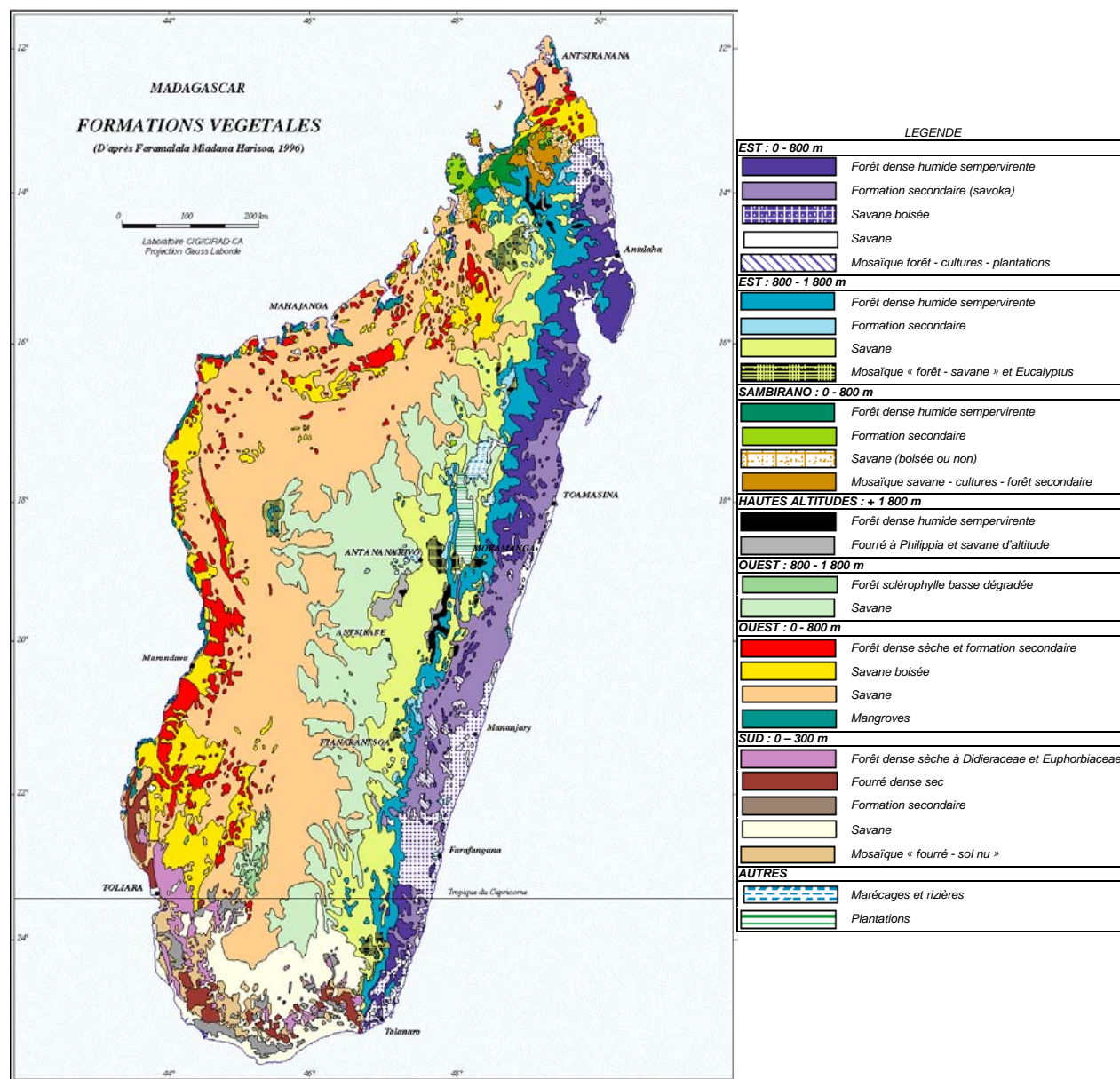
**Les atouts de Madagascar.** L'île de Madagascar, située dans l'Océan Indien, présente tous les caractères d'un petit continent doté d'une nature extraordinairement variée. Sa flore présente un intérêt scientifique tout particulier en raison de sa diversité, de son ancienneté et de sa très grande richesse.

La flore malgache actuelle est marquée par la persistance de genres et d'espèces très archaïques appartenant à des familles seulement connues à l'état de fossiles sur les autres continents. L'estimation du nombre total de taxons des plantes vasculaires de Madagascar varie de 10 000 à 12 000 espèces selon les auteurs, réparties en 1 200 à 1 600 genres appartenant à 200 familles environ et dont le niveau d'endémisme est supérieur à 80 % [Rajeriarison, 1996]. Ce taux d'endémisme est d'ailleurs élevé à tous les niveaux taxonomiques, 8 familles sont considérées comme étant entièrement endémiques de l'île.

Tous ces facteurs contribuent à faire de Madagascar une zone de choix pour la mise en lumière de nouvelles molécules. Les forêts primaires et secondaires de l'île (figure I 1) sont de vastes réservoirs d'espèces qui peuvent fournir de nouveaux composés naturels aux chimistes et/ou qui sont le point de départ pour le développement de nouveaux médicaments. Cette existence de matériel thérapeutique non découvert est une des raisons les plus importantes qui militent en faveur de la protection des forêts tropicales et de la biodiversité en général.

En travaillant sur des plantes endémiques, aux caractéristiques potentiellement uniques, la probabilité est plus grande de trouver de nouvelles molécules (et ainsi de nouvelles voies thérapeutiques) élargissant d'autant la connaissance de la biodiversité de ce pays insulaire.

**Des ressources à préserver.** La société Serdex, créée par les Laboratoires Laroche-Navarron et aujourd'hui devenue division de Bayer Consumer Care, a, dans les années 60 et sur proposition des Professeurs Ratsimamanga et Boiteau, mis sur le marché des cicatrisants, les triterpènes de *Centella asiatica* sous le nom de Madécassol. Dès lors, une relation étroite s'est nouée entre Serdex et Madagascar qui demeure à ce jour.



**Figure I 1. Carte des formations végétales de Madagascar.**

Les objectifs de cette étroite collaboration sont de valoriser la ressource végétale pour la sauvegarder, de contribuer ainsi à son exploitation dans le respect de la diversité des espèces et de faire prendre conscience aux populations des risques encourus du fait de la déforestation (toujours en cours à Madagascar bien que de nombreuses résolutions internationales ou nationales aient été adoptées).

Les plantes exploitées à Madagascar proviennent de récoltes et de collectes effectuées dans la nature. La régénération naturelle qui assure la production n'arriverait pas à faire face à des prélèvements irrationnels et non contrôlés. L'objectif de Serdex est de contribuer à préserver la ressource par une concertation étroite avec les institutions malgaches et par une politique de prise en compte du

développement durable et du commerce équitable, contreparties indispensables à la satisfaction des besoins industriels en plantes (qualitatifs et quantitatifs). Dans cette optique, des « bonnes pratiques de collecte » ont été définies et mises en place à Madagascar par Serdex pour les acteurs locaux de la filière : les paysans collecteurs et Sotramex, la société malgache qui centralise la collecte et réalise une partie des extraits de plantes. Ce « contrat moral » reposant sur l'application des bonnes pratiques permet d'assurer un revenu régulier aux collecteurs, développe un volet social en faveur des communautés locales (programme de scolarisation) et assure la pérennité des ressources, principes fondamentaux du développement durable.

En outre, les plantes des programmes de recherche et développement de Serdex proviennent des forêts secondaires d'altitude de l'Est de l'île, dans la région de Moramanga (Figure I 1), aucun prélèvement n'est effectué dans les forêts primaires déjà extrêmement menacées.

## 1.2. Utilisation des plantes en médecine traditionnelle

Depuis 150 ans, les plantes médicinales ont fourni à la pharmacie des médicaments très efficaces. Aujourd'hui, de nombreux travaux menés dans le domaine de l'ethnopharmacologie, nous montrent que les plantes utilisées en médecine traditionnelle et qui ont été testées sont souvent d'une part, des plantes efficaces dans les modèles pharmacologiques et d'autre part seraient quasiment dépourvues de toxicité [Gurib-Fakim, 2006].

L'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie mettent en relation les savoirs ancestraux des médecins traditionnels et les connaissances scientifiques actuelles. Ce sont avant tout des domaines de recherche interdisciplinaire à l'interface des sciences de l'Homme, comme l'ethnologie, l'histoire, la linguistique, et des sciences de la nature, comme la botanique, la pharmacologie, la pharmacognosie, la médecine.

Les informations de terrain recueillies auprès des populations (les véritables tradipraticiens ne subsistent plus que dans des zones reculées) sont le reflet d'une approche culturelle de la maladie qui, à Madagascar comme dans d'autres médecines traditionnelles, est fondée sur la symptomatologie. Tel mélange de plantes est indiqué pour une douleur ou un symptôme donné et non pour soigner une maladie. La traduction de ces données symptomatiques brutes en termes de médecine étiologique est délicate et le recours d'un médecin est souvent indispensable à la caractérisation de la maladie. Le traitement varie selon le comportement du malade, ses dires, le rang social avec la prise en compte de son histoire familiale. De plus, le tryptique aliment-médicament-poison rend difficile la catégorisation entre actifs et toxiques qui peuvent être employés, à dessein, simultanément. Il est également nécessaire d'avoir à l'esprit que l'utilisation médicinale des plantes est souvent associée à des concepts irrationnels qui font appel au mystique. La difficulté vient ainsi de la nécessité de déceler, dans les mélanges traditionnellement employés, les plantes dont la présence fréquente fait penser qu'elles sont susceptibles de traiter un aspect donné de la maladie.

L'ethnopharmacologie et l'ethnobotanique ont donc pour finalité la compréhension des pratiques et des représentations relatives à la santé, à la maladie, et la description, l'évaluation thérapeutique des plantes utilisées dans les pharmacopées traditionnelles.

L'usage empirique des différentes préparations traditionnelles plantes est donc extrêmement important pour une sélection efficace de plantes puisque la plupart des métabolites secondaires de plantes employées en médecine moderne ont été découverts par l'intermédiaire d'investigations ethnobotaniques [Gurib-Fakim, 2006].

Les enquêtes ethnobotaniques, menées de 1973 à 1990, en collaboration avec l'Institut Malgache de Recherches Appliquées (IMRA) ont été effectuées par l'instauration de relations quotidiennes avec les populations, notamment dans les gradins Est de l'île aux confins de la forêt primaire d'altitude et ont permis le recueil de nombreuses informations quant à l'emploi des ressources végétales environnantes.

### 1.3. Aspects botaniques et chimiotaxonomiques

Dans un second temps, la connaissance des plantes choisies au travers des enquêtes ethnobotaniques peut être enrichie par la connaissance botanique des espèces citées.

Les plantes appartenant aux mêmes familles ou à des familles voisines et/ou qui poussent dans les mêmes biotopes sont susceptibles de synthétiser les mêmes molécules chimiques. La chimiotaxonomie, ou classification des plantes en fonction des leurs métabolites secondaires complète les classifications botaniques basées sur des critères morphologiques et moléculaires (génétiques par exemple) [Grayer *et al.*, 1999]. Elle permet, si des substances sont particulièrement connues pour leur potentiel thérapeutique, de choisir des plantes chimiotaxonomiquement proches de celles dans laquelle la substance a été détectée et étudiée.

Par ailleurs, connaître la rareté éventuelle d'une espèce, son époque de floraison et sa disponibilité en terme de quantité peuvent également constituer des critères de choix.

### 1.4. Les apports de la littérature

Les critères que nous venons d'évoquer ayant permis d'établir une liste préliminaire de plantes potentiellement intéressantes, nous avons réalisé une bibliographie détaillée des connaissances phytochimiques des espèces et de leurs genres d'appartenance.

Dans l'optique de la découverte de nouvelles molécules et/ou de nouvelles voies d'application thérapeutiques (ou cosmétiques), il est plus judicieux de choisir des plantes qui ont été peu ou pas travaillées chimiquement. Cependant, si la famille ou le genre a déjà été étudié, il sera plus facile de trouver des procédés analytiques, d'identifier rapidement les composés déjà connus et de trouver des

traceurs qualitatifs et quantitatifs. Cela permet également d'éliminer les genres et/ou les espèces connues pour leur toxicité.

## **2. Sélection des extraits : criblage biologique**

Quand les causalités des traitements, les principes thérapeutiques et en particulier les modes d'utilisations traditionnels sont établis, un protocole d'étude pharmacologique peut être mis en place.

Les travaux de laboratoire, guidés par les usages vernaculaires, ont pour double but de constater le bien-fondé de l'usage d'une plante donnée en démontrant les effets biologiques par des techniques pharmacologiques et d'orienter les travaux chimiques ultérieurs vers une certaine fraction chimique de la plante.

Ainsi, pour cette étude, une recherche d'activité préalable sur une liste d'espèces endémiques (établie grâce aux critères que nous avons évoqués précédemment) a été effectuée, avec pour résultat des réponses parfois différentes des usages recensés sur le terrain. En effet, il n'existe pas toujours de cible biologique correspondant exactement à une allégation traditionnelle et de la même manière, il peut en exister plusieurs. De plus, comme nous l'avons vu précédemment, la médecine traditionnelle repose souvent sur des bases mystiques donc invérifiables.

La collaboration entre Serdex et l'IMRA a servi en partie à l'étude et la mise au point de médicaments de substitution à bas coût pour le marché malgache, développés, fabriqués et distribués dans un contexte économique difficile. Il y a donc eu des retombées pratiques et locales résultant des recherches effectuées, en terme de santé publique. Le savoir a été, à ce jour, largement restitué.

Les criblages pharmacologique et biologique menés par Serdex ont permis, pour un certain nombre de plantes pré-sélectionnées, de confirmer ou d'infirmer leur activité présumée et le cas échéant, d'indiquer quel est l'extrait actif. Pour des raisons de confidentialités, les résultats de ce criblage ne seront pas présentés ici.

Pour le présent travail, en tenant compte de tous ces critères, nous avons sélectionné trois plantes endémiques de Madagascar ayant un fort potentiel d'activité du fait de leurs usages traditionnels largement répandus : *Tambourissa trichophylla* Baker (*Monimiaceae*), *Agauria polyphylla* Baker (*Ericaceae*) et *Embelia concinna* Baker (*Myrsinaceae*).

Nous avons choisi d'étudier une quatrième plante : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver bien que les études pharmacologiques menées par Serdex n'aient pas démontré d'activité pour cette plante. En effet, comme nous le développerons dans le chapitre suivant, une confusion botanique peut être faite avec *Agauria polyphylla* et nous allons tenter de faire une distinction phytochimique entre ces espèces.

Une synthèse des connaissances bibliographiques à la fois botaniques et phytochimiques de ces plantes et des familles auxquelles elles appartiennent est présentée au chapitre suivant.

## **II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1. Présentation de *Tambourissa trichophylla* Baker (*Monimiaceae*)

### 1.1. La famille des *Monimiaceae* Juss.

La famille des *Monimiaceae* est une famille de paléoarbres dicotylédons de divergence ancienne comprenant environ 200 espèces réparties dans 22 genres [Spichiger *et al.*, 2000]. Ce sont de petits arbres, des arbustes, producteurs d'huiles essentielles, à feuilles persistantes présents dans les régions sub-tropicales à tropicales de l'hémisphère sud, particulièrement en Asie australe [Philipson, 1993].



Figure II 1. Répartition mondiale des *Monimiaceae* selon Stevens [Stevens, 2001].

**Position systématique.** Selon les classifications botaniques classiques pré-moléculaires, les *Monimiaceae* sont des dicotylédones appartenant à l'ordre des *Laurales* (Tableau II 1), ordre qui comprend également les *Amborellaceae*, *Trimeniaceae*, *Gomortegaceae*, *Calycanthaceae*, *Idiospermaceae*, *Lauraceae* et *Hernandiaceae* [Cronquist, 1988].

Tableau II 1. Taxonomie des *Monimiaceae* selon Cronquist [Cronquist, 1988].

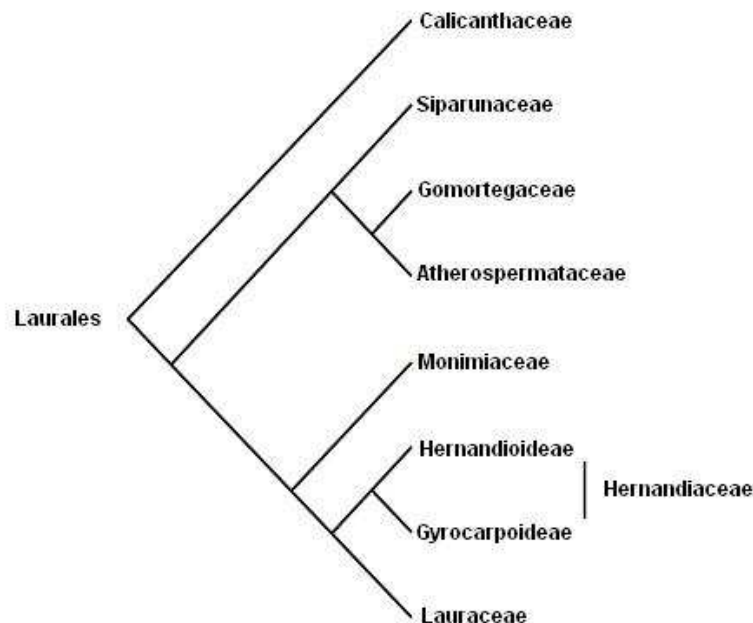
<i>Plantae, Tracheobionta</i> (Plantes vasculaires)	
Embranchement :	<i>Spermatophyta</i> (Plantes à graines)
Sous-Embranchement :	<i>Angiospermae</i> (Plantes à fleurs)
Classe :	<i>Magnolopsida</i> (Dicotylédones)
Sous-classe :	<i>Magnoliidae</i>
Ordre :	<i>Laurales</i>
Famille :	<i>Monimiaceae</i>

Parmi ces classifications basées essentiellement sur des critères morphologiques et anatomiques, celle de Cronquist est la plus utilisée. Cependant, les apports récents de la biologie moléculaire, avec le développement de la cladistique moderne ou de la systématique moléculaire basée sur l'analyse des séquences de gènes, ont bouleversé les classifications usuelles et ont donné naissance en 1998 à une nouvelle classification ordinaire des plantes à fleurs [APG, 1998]. La classification APG est la classification scientifique des angiospermes la plus récente établie selon les travaux d'un groupe de chercheurs : the *Angiosperm Phylogeny Group*. Reflet d'un consensus sur les connaissances acquises



lors de sa publication en 1998, cette classification a été révisée en 2003 [APG, 2003]<sup>1</sup>. Elle traduit les efforts faits en systématique pour que les systèmes de classification reflètent au mieux la phylogénie des familles mise en lumière par les avancées constantes de la génétique [Spichiger *et al.*, 2000].

Aujourd'hui, l'appartenance des *Monimiaceae* aux *Laurales* est indiscutablement admise (figure II 2). La classification infrafamiliale des *Monimiaceae* a fait l'objet de nombreuses investigations dans les années 70 et au début des années 80 avec les travaux de Phillipson [Phillipson, 1993]. Certains taxonomistes préféraient alors mettre l'accent sur la diversité des schémas floraux présents dans la famille en la divisant en plusieurs petites familles, alors que d'autres soulignaient la cohérence globale de la famille [Phillipson, 1987]. Ce dernier point de vue en faveur de la reconnaissance des *Monimiaceae* comme une seule famille a finalement été adopté, choix justifié non seulement par la cohérence morphologique de la famille mais également par les écarts qui la séparent des autres familles des *Laurales*.



**Figure II 2. Position systématique des *Monimiaceae* selon l'Angiosperm Phylogeny Group [Stevens, 2001].**

En 1987, Phillipson répartissait 32 genres de *Monimiaceae* en 6 sous-familles et 8 tribus (figure II 3). Cependant, l'étude de la phylogénie des *Laurales* par Renner, en 1999, à partir de certaines séquences de gènes, a établi que les *Monimiaceae* étaient clairement polyphylétiques si on y incluait les *Atherospermatoideae* et les *Siparunoideae*. Ces sous-familles ont donc été élevées au rang de famille, respectivement les *Atherospermataceae* et les *Siparunaceae* (figure II 2) [Renner, 1999].

<sup>1</sup> C'est pourquoi la classification de Cronquist est encore utilisée comme référence dans de nombreux ouvrages dans un souci pragmatique de disposer d'outils de classement stables pour permettre, entre autres, la communication entre botanistes.

Sous-famille 1. <i>Hortonoideae</i> Genre : <i>Hortonia</i>	Sous-famille 5. <b><i>Mollinedioideae</i></b> Tribu 1. <b><i>Hedycaryeae</i></b> Genres : <i>Tambourissa</i> , <i>Hedycarya</i> , <i>Levieria</i> , <i>Ehippiandra</i> , <i>Decarydedron</i>
Sous-famille 2. <i>Atherospermatoideae</i> Tribu 1. <i>Atherospermateae</i> Genres : <i>Atherosperma</i> , <i>Laureliopsis</i> Tribu 2. <i>Laurelieae</i> Genres : <i>Daphnandra</i> , <i>Dryadodaphne</i> , <i>Doryphora</i> , <i>Laurelia</i> , <i>Nemuaron</i>	Tribu 2. <i>Mollinedieae</i> Genres : <i>Mollinedia</i> , <i>Kibara</i> , <i>Wilkiea</i> , <i>Matthaea</i> , <i>Keiroa</i> Tribu 3. <i>Hennecartieae</i> Genre : <i>Hennecartia</i>
Sous-famille 3. <i>Siparunoideae</i> Genre : <i>Siparuna</i>	Sous-famille 6. <i>Monimioideae</i> Tribu 1. <i>Palmerieae</i> Genre : <i>Palmeria</i> Tribu 2. <i>Monimieae</i> Genre : <i>Monimia</i> Tribu 3. <i>Peumiaea</i> Genre : <i>Peumus</i>
Sous-famille 4. <i>Glossocalycoideae</i> Genre : <i>Glossocalyx</i>	

Figure II 3. Synopsis des sous-familles et tribus des *Monimiaceae* d'après Philipson [Philipson, 1987].

**Caractéristiques botaniques des *Monimiaceae*.** Les *Monimiaceae* sont des arbres ou arbrisseaux, parfois grimpants, sempervirents, à huiles essentielles et souvent accumulateurs d'aluminium. Les feuilles sont opposées, simples, à marge dentée ou entière et contiennent des cellules sphériques à huile essentielle dans le limbe. Certaines ponctuations du limbe peuvent être laticifères. Les branches sont souvent aplaties au niveau des nœuds. L'inflorescence peut être axillaire (racèmes) ou terminale (rarement une fleur solitaire). Les fleurs, de petite taille, sont actinomorphes, bisexuées ou unisexuées le plus souvent et présentent un réceptacle généralement très développé. Le périanthe est généralement peu visible et composé de tépales sépaloïdes ou pétaloïdes. Dans les fleurs mâles, de nombreuses étamines sont arrangées en spirale ou en verticille, les filaments courts peuvent être nectarifères à la base et les anthères sont dressées et à déhiscence longitudinale ou valvulaire. Les fleurs femelles possèdent de nombreux carpelles (jusqu'à plus de 2000) 1-ovulés, sessiles et libres ou insérés dans le réceptacle. Les fruits sont des drupes séparées ou des akènes plumeux, soit inclus dans le réceptacle charnu et persistant, soit exposés par de nombreux modes de fendage. Les graines sont à endosperme huileux [Maberley, 1987 ; Philipson, 1993].

**Utilisations traditionnelles des *Monimiaceae*.** De nombreux genres de cette famille produisent du bois de coupe ou du bois d'œuvre d'intérêt local (genres *Hedycarya*, *Doryphora*, *Peumus*), d'autres sont cultivés comme plantes ornementales (*Peumus*, *Hedycarya*, *Siparuna*). Certains genres ont des fruits comestibles (*Peumus*). Quelques espèces produisent des huiles essentielles utilisées localement en parfumerie. L'écorce de *Peumus boldus* Molina est utilisée pour le tannage du cuir et la teinture des textiles [Watson et Dallwitz, 1992].

Certaines espèces sont utilisées localement par les tradipraticiens. En Amérique du Sud, *Mollinedia brasiliensis* Schott ex Tul. est réputée pour être un puissant antispasmodique et être utile contre les crampes [Leitão et al., 1999]. *Peumus boldus* est utilisé comme cholagogue et cholérétique [Bruneton, 1999] et apparaît dans de nombreuses pharmacopées. Les *Monimiaceae* sont des plantes considérées comme toniques, stimulantes, digestives ou carminatives.

## 1.2. Genre *Tambourissa* Sonn. et *T. trichophylla* Baker

Le genre *Tambourissa* Sonn. est représenté par environ 43 espèces exclusivement distribuées sur les îles de l'ouest de l'océan indien : à Madagascar pour la plupart (26 spp.), aux Comores (5 spp.) et sur les îles Mascareignes : l'île Maurice (10 spp.) et l'île de la Réunion (2 spp.) [Lorence, 1985].

Ces espèces montrent un fort degré d'endémisme, chacune étant restreinte à une île donnée et fréquemment à un habitat donné sur l'île en question. Dans ces zones géographiques, les *Tambourissa* sont occasionnellement présents ou plus communs localement sur l'ensemble de la forêt et du fourré sempervirents, humides et sub-humides de montagne depuis le niveau de la mer jusqu'à plus de 2 000 mètres d'altitude [Lorence, 1985].

Les *Tambourissa* ont atteint le plus haut niveau de spécialisation de morphologie florale de toutes les *Monimiaceae* malgaches de la sous-famille des *Mollinedioideae*. Ces espèces sont généralement remarquables en raison de la particularité de leurs réceptacles floraux et de leurs fruits (représentés figure II 4). On peut reconnaître ce genre à ses fleurs femelles au réceptacle cupuliforme à sphérique, aux carpelles enfouis dans le réceptacle et en particulier à son grand réceptacle fructifère liégeux à ligneux qui se fend pour révéler des fruits rouge-orange [Schatz, 2001].

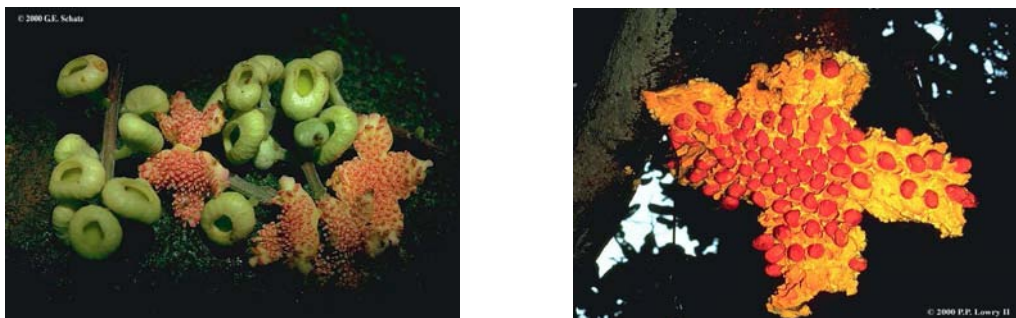


Figure II 4. Fleurs et fruits de *Tambourissa masoalensis* (à gauche) et fruits de *T. nicolliae* (à droite) (source : site Internet du Missouri Botanical Garden).

Les *Tambourissa* (appelés bois tambour ou bois de bombarde à Madagascar et à Maurice) sont utilisés comme bois de construction. A Madagascar, le tronc de *Tambourissa religiosa* A.DC., qui produit une gomme-résine odorante, est utilisé pour la fabrication de cercueils, qui, dit-on, empêchent la putréfaction du corps. Les *Tambourissa* sont connus en Anjouan et sur l'île de la Grande Comore pour l'utilisation de leurs feuilles en infusion calmant et soulageant la douleur [Lorence, 1985].

*Tambourissa trichophylla* Baker est une espèce endémique de Madagascar où elle a pour noms vernaculaires *Amborahasa* ou *Ambura* [Cavaco et Humbert, 1957].

Cette espèce est décrite dans la flore de Madagascar et des Comores.

*T. tambourissa* Baker : Arbre de 5-12 m de haut ; jeunes rameaux densément tomenteux. Feuilles opposées, oblongues à oblongues lancéolées, de 8-20 cm de long et de 2.5-5.8 cm de large, brièvement acuminées au sommet, à apex aigu, arrondies à la base, dentées au tiers supérieur à dents espacées, subcoriaces, à poils épars au-dessus, densément tomenteuses en dessous, à pétiole de 3 à 12 mm de long, épais, poilu (figures II 5 et II 6). Fleurs mâles de 5-6 mm de diamètre, à pédicelle de 5 mm de long, densément tomenteuses, solitaires ou en inflorescences racémiformes, axillaires ou terminales, de 1.5-3 cm de long ; bractées et bractéoles ovales lancéolées, de 5 mm de long, densément poilues ; réceptacle globuleux, densément poilu extérieurement, épais ; étamines nombreuses, plurisériées ; anthères ovales, à loges latérales, déhiscentes par une fente longitudinale ; filets larges, glabres, sessiles. Fleur femelle de 0.6 cm de diamètre, globuleuse, densément poilue, solitaire, brièvement pédonculée, à carpelles nombreux. Fruits globuleux, déprimés, de 4.5 cm de diamètre, à péricarpe coriace, renfermant de nombreuses drupes [Cavaco et Humbert, 1957].



**Figure II 5. Feuilles de *Tambourissa trichophylla* (source : Laboratoires Bayer Consumer Care division Serdex).**

La planche botanique de *T. trichophylla* tirée de cette même flore est présentée figure II 6.



*Tambourissa* (A. Cavaco).

MONIMIACÉES

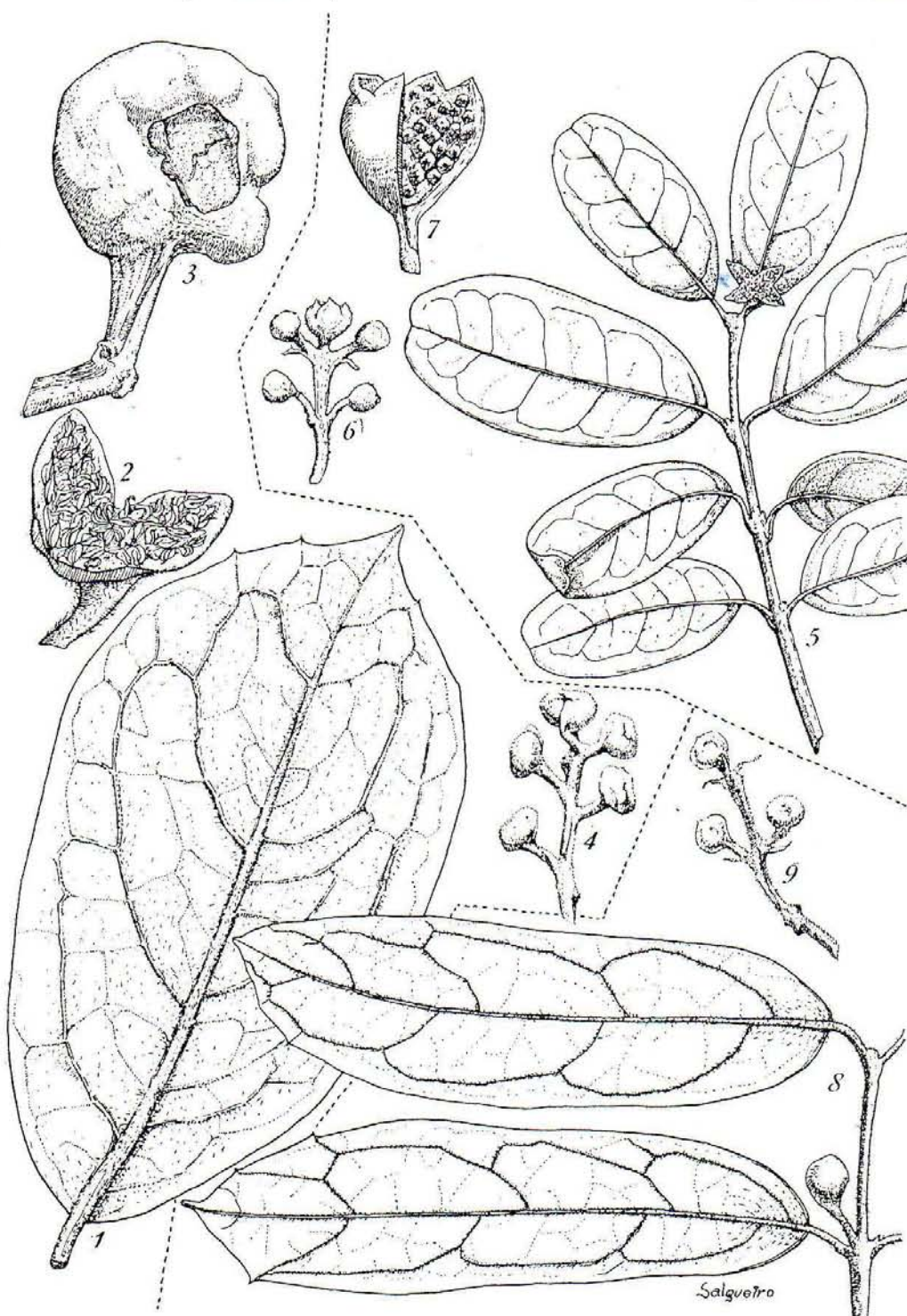


FIG. VII. — *Tambourissa trichophylla* var. *Thouvenotii* : 1, feuille  $\times 2/3$ ; 2, coupe verticale de la fleur mâle  $\times 2$ ; 3, fruit  $\times 2/3$ ; 4, inflorescence femelle  $\times 2/3$ . — *T. Baronii* : 5, rameau avec fleur mâle  $\times 2/3$ ; 6, inflorescence mâle  $\times 2/3$ ; 7, fleur femelle  $\times 2$ . — *T. trichophylla* : 8, rameau  $\times 2/3$ ; 9, inflorescence mâle  $\times 2/3$ .

Figure II 6. Planche botanique de quelques espèces du genre *Tambourissa* [Cavaco et Humbert, 1957].

### 1.3. Principaux métabolites secondaires des *Monimiaceae*

Dans cette partie, nous aborderons la phytochimie des *Monimiaceae* au sens le plus récent, c'est-à-dire en excluant les genres qui appartiennent désormais aux *Atherospermataceae* et aux *Siparunaceae*.

**Alcaloïdes.** Les alcaloïdes, de type benzyltétrahydroisoquinoléine, constituent une classe chimique importante de la famille des *Monimiaceae*. Les différents alcaloïdes de ce groupe sont caractéristiques d'un certain nombre de familles de l'ordre des *Magnoliales* (sensu Cronquist), des *Laurales* ou de *Papaverales*. Au sein des benzyltétrahydroisoquinoléines, les aporphinoïdes (proaporphines, aporphines, oxoaporphinoïdes et leurs dérivés) forment le plus grand groupe d'alcaloïdes isolés des *Monimiaceae* [Hegnauer, 1990 ; Leitão *et al.*, 1999]. Il s'agit d'un vaste groupe de plus de 500 composés surtout fréquents dans certaines familles assez archaïques comme les *Monimiaceae* [Bruneton, 1999]. Le tableau II 2 recense une cinquantaine d'alcaloïdes isolés de la famille des *Monimiaceae* et la figure II 7 rassemble les structures de ces alcaloïdes.

**Tableau II 2. Alcaloïdes isolés de *Monimiaceae* d'après Leitão [Leitão *et al.*, 1999 ; DNP, 2006].**

Genre	Alcaloïdes <sup>a</sup>
<b><i>Hedycarya</i></b> ( <i>H. angustifolia</i> A.Cunn., <i>H. baudouinii</i> Baill.)	boldine (1), lauréline (2), cinnamolaurine (3), isosévanine (4), calycotomine (5), hédycarine (6)
<b><i>Laurelia</i></b> ( <i>L. philipiana</i> Looser, <i>L. novae-zelandiae</i> A.Cunn., <i>L. sempervirens</i> Tul.)	4-hydroxyanonaïne, 4-hydroxynornanténine, 4-hydroxynornanténine, anonaïne (7), athéroline (8), boldine, corydine (9), isoboldine, isolauréline, lauréline, laurépukine, laurépukine-N-oxyde, laurólitsine, laurotétanine, liriódénine, mécambroline (10), michelalbine, nanténine (11), norcorydine, norioscorydine, nornanténine, nornuciférine, norushinsunine, obabérine, obovanine, oxolauréline, oxonanténine, oxoputérine, oxyacantine, pukatéine (12), pukatéine-N-oxyde, pukatéin-méthyléther, réticuline (13), roémérine (14), romnéine, secoisotétrandrine, stépharine (15), talbugosine, 4S-hydroxy-nornanténine, assimilobine
<b><i>Mollinedia</i></b> ( <i>M. costaricensis</i> Donn.SM.)	mollinéine (19)
<b><i>Monimia</i></b> ( <i>M. rotundifolia</i> Thou.)	athéroline, boldine, laurólitsine (16), laurotétanine, N-méthyllaurotétanine, norglaucine
<b><i>Palmeria</i></b> ( <i>P. arfakiana</i> Becc. et A.C.Sm., <i>P. gracilis</i> Perkins)	laurotétanine (17), laurólitsine, N-méthyllaurotétanine
<b><i>Peumus</i></b> ( <i>P. boldus</i> Molina)	boldine, isoboldine, isocorydine, isocorydine-N-oxyde, laurólitsine, laurotétanine, N-méthyllaurotétanine, norisocorydine, réticuline, sinoacutine (18)

<sup>a</sup> Les numéros entre parenthèses renvoient aux structures présentées à la figure II 7.

A l'heure actuelle, seulement deux aporphines sont incluses dans des spécialités pharmaceutiques disponibles sur le marché français dont l'une, la boldine (1) (figure II 7) est extraite des feuilles et de l'écorce d'une *Monimiaceae* : le boldo (*Peumus boldus* Molina) et entre dans la composition de

spécialités proposées dans le traitement d'appoint des troubles dyspeptiques et des brûlures oesophagiennes. L'autre aporphine est un produit de synthèse [Bruneton, 1999].

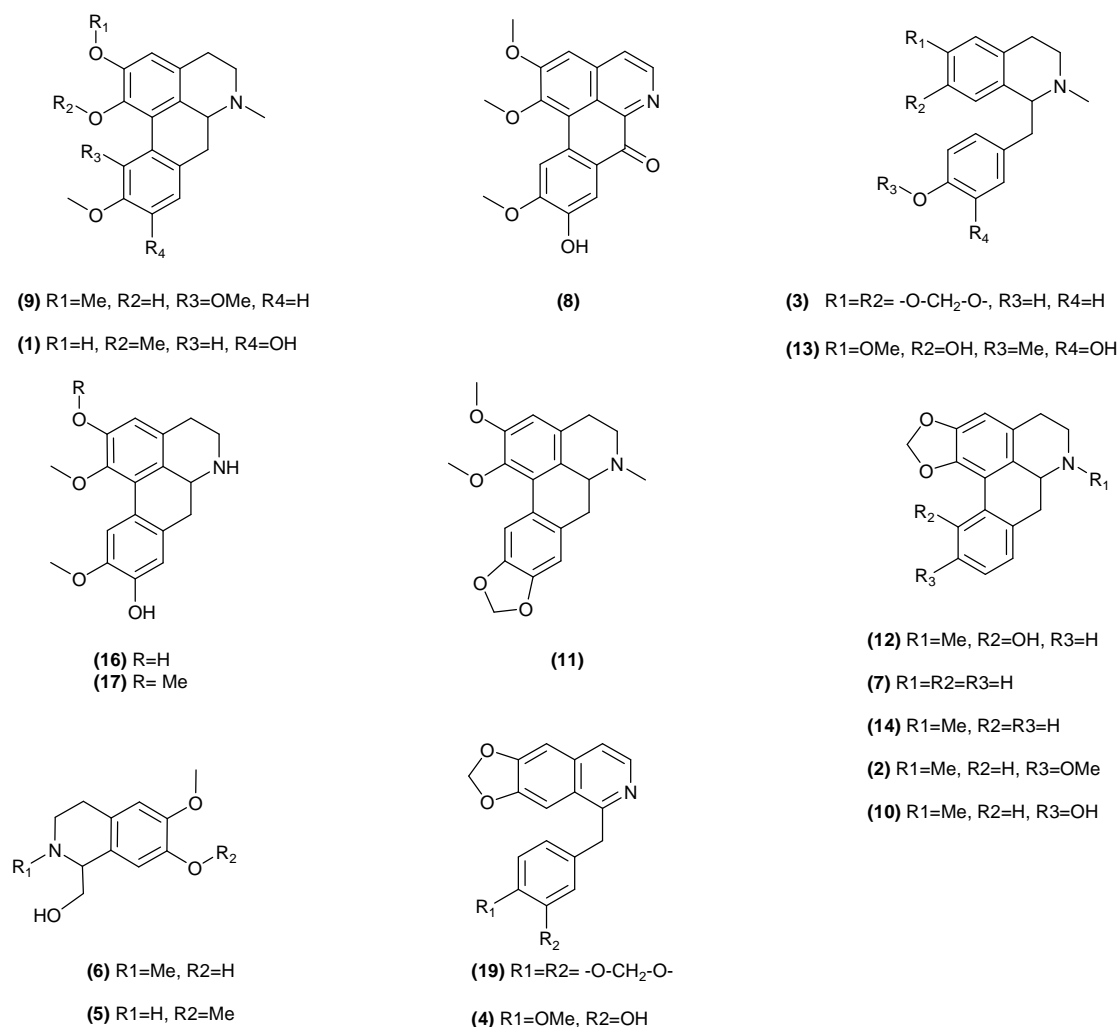


Figure II 7. Exemples d'aporphinoïdes extraits de *Monimiaceae* d'après Leitão et Bruneton [Bruneton, 1999 ; Leitão et al., 1999].

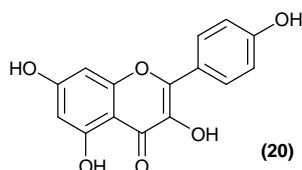
**Huiles essentielles.** La composition générale de l'huile essentielle des représentants de la famille des *Monimiaceae* est un mélange de terpènes et de dérivés phénylpropanoïdes [Hegnauer, 1990 ; Leitão et al., 1999]. Les principaux composants des huiles essentielles de quelques espèces de *Monimiaceae* ont été recensés dans le tableau II 3 [DNP, 2006].

Tableau II 3. Composants des huiles essentielles de quelques espèces de *Monimiaceae* [Hegnauer, 1969 ; Hegnauer, 1990 ; DNP, 2006].

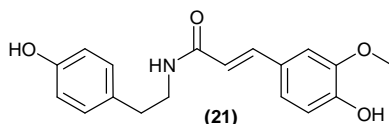
Espèces	Principaux constituants de l'huile essentielle	Références
<i>Hedycarya angustifolia</i> A.Cunn	Elémol, hédycaryol, $\alpha$ -eudesmol, $\beta$ -eudesmol, $\gamma$ -eudesmol	[Brophy et al., 2005]
<i>Hedycarya arborea</i> Forst.	Sitostérol, stigmastérol, campesterol, hexacosan-1-ol	[Brophy et al., 2005]
<i>Kibara rigidifolia</i> A.C.Sm.	$\beta$ -ocimène (formes Z et E), $\alpha$ -copaène, $\beta$ -caryophyllène,	[Brophy et al., 1998]

	aromadendrène, viridiflorène, bicyclogermacrène, germacrène B, guaiol, spathulénol, globulol, élémicine	
<b><i>Laurelia philippiana</i> Looser</b>	Cinéole, linalool	[Hegnauer, 1990]
<b><i>Laurelia sempervirens</i> Tul.</b>	3-(3,4-methyldendioxyphenyl) propen-2-en-1-ol	[Hegnauer, 1990]
<b><i>Levieria acuminata</i> Perk.</b>	3-carène, terpinolène, $\delta$ -cadinène, calamène, viridiflorène, cadina-1,4-diène, spathulénol, <i>n</i> -dodecanal, <i>n</i> -dodecanol, <i>n</i> -undecanal, tridécan-2-one	[Brophy et al., 1998]
<b><i>Mollinedia gilgiana</i> Perk., <i>M.marliae</i> Peixoto &amp; V.Peireira</b>	Phytol, sitostérol, stigmastérol	[Claros et al., 2000]
<b><i>Peumus boldus</i> Molina</b>	Ascaridol, cinéole, $\alpha$ -fenchol, $\alpha$ -pinène, $\beta$ -pinène, $\alpha$ -terpinol, camphène, camphor, fenchène, $\gamma$ -terpinène, limonène, linalool, <i>p</i> -cymène, <i>p</i> -cymol, terpinène-4-ol, terpinolène, eucalyptol	[Kretmair, 1952]
<b><i>Tambourissa leptophylla</i> A.DC.</b>	Limonène, cis- $\alpha$ -bergamotène, $\delta$ -3-carène, curcumène, trans- $\alpha$ -bergamotène, $\alpha$ -copaène, $\alpha$ -pinène, <i>p</i> -cymène, bicyclogermacrène	[Gallori et al., 2001]

**Flavonoïdes.** Les flavonoïdes décrits à ce jour pour les *Monimiaceae* sont quasiment toujours des flavonols, très rarement des flavones, substitués par des groupements hydroxyles et/ou *O*-glycosylés, très peu étant méthoxylés. Des génines de type quercétine, isorhamnétine ont été isolées des feuilles de différentes espèces de *Monimiaceae* mais il est intéressant de noter la présence marquée de dérivés du kaempférol (**20**) dans les flavonoïdes de cette famille [Hegnauer, 1990].



**Polyphénols au sens large.** Les composés phénoliques ont été peu décrits dans la famille, on peut citer des dérivés d'acides cinnamiques comme le moupinamide (**21**) décrits dans les bourgeons de *Mollinedia gilgiana* [Claros et al., 2000].





### 1.4. Travaux antérieurs sur le genre *Tambourissa*

Le genre *Tambourissa* est connu pour produire des huiles essentielles. Les travaux de Gallori *et al.* sur un extrait étheropétrolique de téguments de fruits de *T. leptophylla* A.DC. ont permis d'identifier une quarantaine de composés parmi lesquels le limonène (24 %) **(29)**, bergamotène (23 %) **(22)**, le  $\Delta$ -3-carène (8 %) **(23)**, le curcumène (6 %) **(26)**, l' $\alpha$ -copaène (4 %) **(24)**, l' $\alpha$ -pinène (4 %) **(28)**, le *p*-cymène (4 %) **(25)** et le bicyclogermacrène (3 %) **(27)** sont les plus abondants (figure II 8). Cette huile essentielle s'est révélée active *in vitro* contre le champignon microscopique pathogène responsable de la cladosporiose des *Cucurbitaceae* : *Cladosporium cucumerinum* [Gallori *et al.*, 2001].

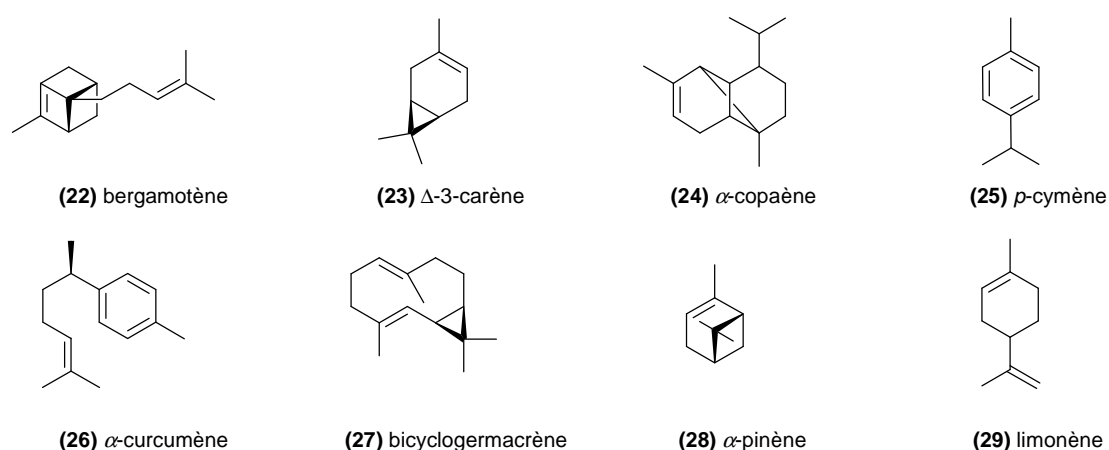


Figure II 8. Constituants principaux de l'huile essentielle de *T. leptophylla* [Gallori *et al.*, 2001].

A notre connaissance, il n'existe aucune donnée sur l'espèce *T. trichophylla*.

## 2. Présentation de *Agauria salicifolia* Hook.f. ex Oliver et *Agauria polyphylla* Baker (*Ericaceae*)

### 2.1. La famille des *Ericaceae* Juss.

Grande famille cosmopolite représentée par 124 genres (dont *Arbutus* (arbousier), *Calluna* (calune), *Erica* (bruyère), *Rhododendron*) et environ 4 100 espèces [Maberley, 1987], les *Ericaceae* prédominent en Arctique, dans les régions tempérées et dans les montagnes tropicales et extratropicales du sud-est de l'Asie et d'Amérique avec une forte concentration dans l'Himalaya, en Nouvelle-Guinée et dans les Andes (figure II 9). En général, la plus grande densité ainsi que la plus grande diversité des *Ericaceae* se retrouve sous les climats méditerranéens notamment en Australie et en Afrique du Sud [Stevens *et al.*, 2004].



Figure II 9. Répartition mondiale des *Ericaceae* selon Stevens [Stevens, 2001].

Ce sont souvent des plantes à mycorhizes préférant les sols pauvres et acides. Leur habitat est généralement caractérisé par une faible disponibilité en nutriments, un faible taux de matières organiques et souvent une période de sécheresse [Stevens *et al.*, 2004].

**Position systématique.** Du point de vue des classifications systématiques anciennes, la famille des *Ericaceae* fait partie des Dicotylédones et appartient à l'ordre des *Ericales* (tableau II 4) [Cronquist, 1988].

Tableau II 4. Taxonomie des *Ericaceae* selon Cronquist [Cronquist, 1988].

<i>Plantae, Tracheobionta</i>	
Embranchement :	<i>Spermatophyta</i>
Sous-Embranchement :	<i>Angiospermae</i>
Classe :	<i>Magnolopsida</i>
Sous-classe :	<i>Dilleniideae</i>
Ordre :	<i>Ericales</i>
Famille :	<i>Ericaceae</i>

Bien que les limites de la famille des *Ericaceae* soient bien définies, il existe de nombreuses subdivisions en sous-familles et en tribus établies en 1971 puis révisées par les travaux de Stevens en 2004 [Stevens, 1971 ; Stevens *et al.*, 2004]. Les relations phylogénétiques au sein des *Ericaceae* ont été étudiées au moyen d'analyses cladistiques basées sur la combinaison de caractères phénotypiques (morphologie, anatomie, nombre de chromosomes et métabolites secondaires) et de caractères moléculaires (séquences de nucléotides) [Kron *et al.*, 1986 ; Stevens *et al.*, 2004]. Les *Ericaceae* se répartissent en 8 sous-familles (figure II 10), elles-mêmes subdivisées en tribus.

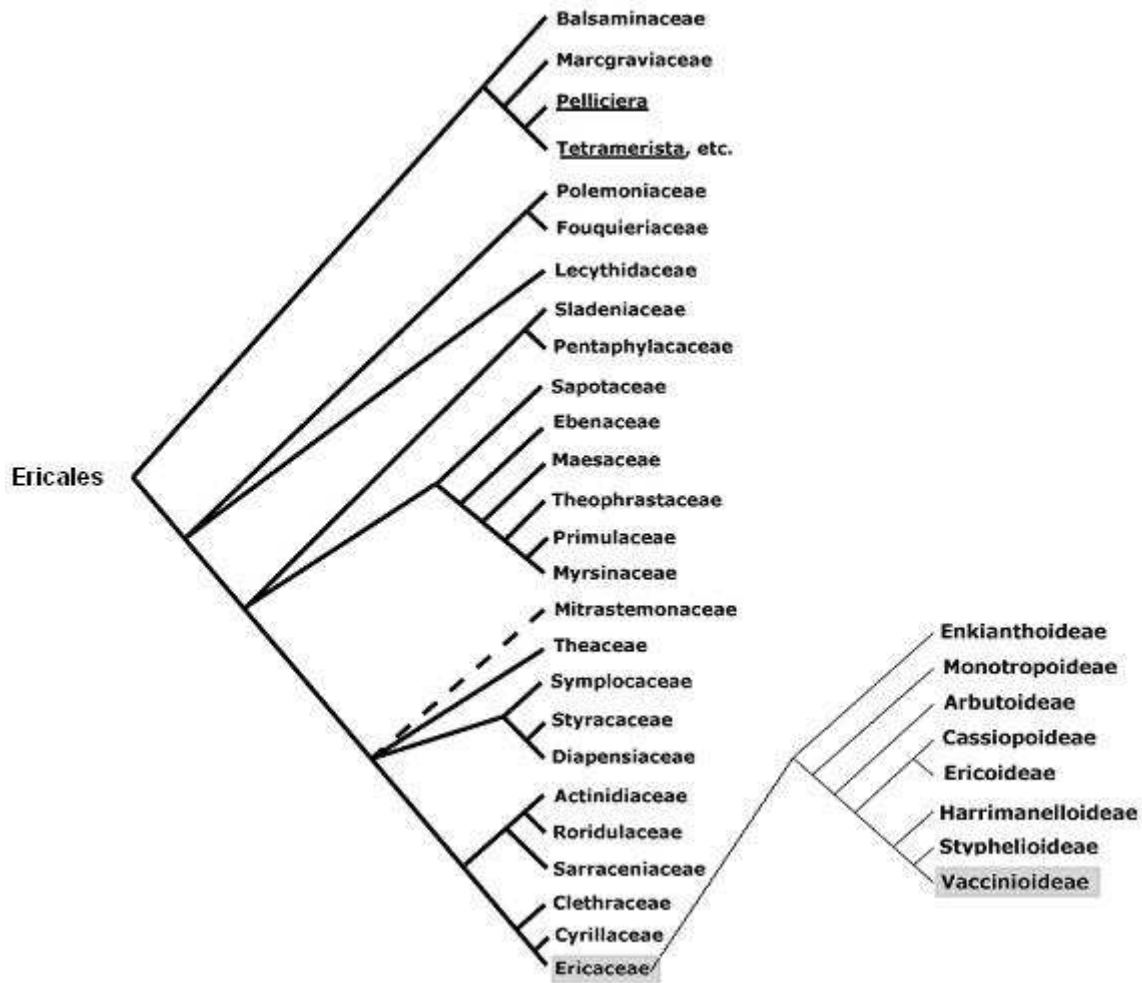


Figure II 10. Position systématique et classification infra-familiale des *Ericaceae* selon l'*Angiosperm Phylogeny Group* [Stevens, 2001].

**Caractéristiques botaniques des *Ericaceae*.** Famille de plantes sempervirentes ou caduques, les *Ericaceae* sont des arbustes, parfois très petits ou subherbacées, des arbres (parfois pachycaules), plus rarement des lianes ou des épiphytes. Les feuilles des *Ericaceae* sont alternes à subopposées ou verticillées, entières ou dentées ou souvent en aiguilles appelées éricoïdes (adaptations à des régimes hydriques défavorables). Elles sont penninervées et dépourvues de stipules. L'inflorescence, très variable, peut être terminale ou axillaire, souvent racémeuse ou paniculée, parfois réduite à une fleur solitaire. Les fleurs, petites, sont actinomorpes pentamères et hermaphrodites. Le calice possède 4-5

sépales plus ou moins soudés à la base ; il est parfois réduit à un anneau ; il peut être persistant et plus ou moins accrescent. Les pétales sont généralement soudés en tube. La corolle est campanulée, en forme d'urne ou sphérique, aux lobes généralement petits et distincts. L'androcée, à 8-10 étamines libres, est obdiplostémone par avortement, les filets sont libres et soudés sur le réceptacle, les anthères sont à déhiscence poricide, souvent avec appendices bicornes. Un disque nectarifère intrastaminal est parfois présent. L'ovaire est souvent supère. Le fruit est une petite baie charnue et indéhiscence ou une capsule sèche à déhiscence loculicide parfois enfermée dans une corolle persistante. La graine est très petite, souvent ailée à albumen charnu [Maberley, 1987 ; Spichiger *et al.*, 2000].

**Utilisations traditionnelles des *Ericaceae*.** Les représentants de la famille des *Ericaceae* produisant de nombreuses baies comestibles telles que la myrtille (*Vaccinium myrtillus* L.), la canneberge (*V. macrocarpum* Aiton, *V. oxycoccos* L.), l'airelle rouge (*V. vitis-idaea* L.), l'arbrousse (*Arbutus unedo* L.) qui peuvent être cultivées [Spichiger *et al.*, 2000]. D'autres au contraire sont des poisons violents (genres *Kalmia* et *Gaultheria*). Des genres, comme *Kalmia* ou *Rhododendron*, contiennent des grayanotoxines (ou andromedotoxines) qui peuvent être fatales ou causer des empoisonnements car elles peuvent passer dans le miel élaboré à partir de ces plantes [Scott *et al.*, 1971 ; Bruneton, 1999]).

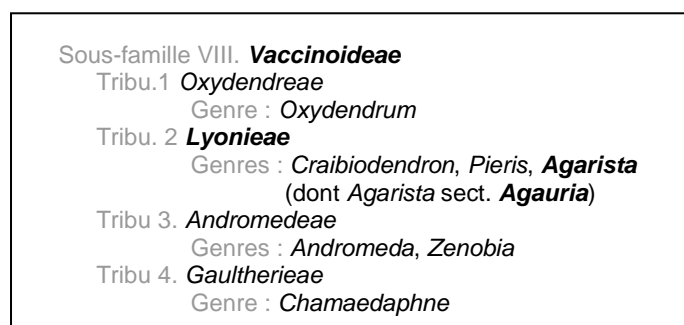
De nombreux genres et espèces d'*Ericaceae* sont cultivés comme plantes ornementales (*Rhododendron*, *Calluna*, *Erica*...). Il existe de nombreuses utilisations mineures d'espèces d'*Ericaceae*, par exemple, les loupes de racines de bruyères (*Erica arborea* L. ou *E. scoparia* L.) sont utilisée pour la fabrication de pipes [Watson et Dallwitz, 1992].

Il est également fait mention de nombreuses utilisations d'*Ericaceae* dans les pharmacopées traditionnelles. Les infusions de feuilles de *Rhododendron* sect. *Ledum*, *Vaccinium arctostaphylos* L. et *Gaultheria procumbens* L. représentaient une importante source d'acide salicylique avant sa production par synthèse. On peut citer également *Arbutus unedo* L., anti-diarrhéique et anti-inflammatoire, *Calluna vulgaris* (L.) Hull et *Arctostaphylos uva-ursi* Spreng, plantes astringentes et antiseptiques urinaires [Spichiger *et al.*, 2000].

## 2.2. Genre *Agauria* Benth. & Hook.f.

Le genre *Agauria* appartient à la plus grande sous-famille des *Ericaceae* : les *Vaccinioideae* et à la tribu des *Lyoniae* (figure II 11) [Kron *et al.*, 1999].

*Agauria* est un genre d'Afrique tropicale très représenté à Madagascar (de 3 à 10 espèces selon les auteurs) et aux Mascareignes. Bien que de nombreuses espèces et sous-espèces aient été décrites, certains auteurs ne reconnaissent qu'une seule espèce variable sur le continent africain, ce grand polymorphisme étant encore plus marqué à Madagascar [Schatz, 2001].



**Figure II 11. Position systématique du genre *Agauria* au sein des *Vaccinioideae* [Kron *et al.*, 1999 ; Stevens *et al.*, 2004].**

Les espèces du genre *Agauria* ont été incluses dans le genre *Agarista*, genre du Nouveau Monde en raison d'importantes similitudes de caractères morphologiques et anatomiques : c'est un des rares exemples de division tropicale transatlantique chez les Angiospermes. En effet, *Agarista*, genre d'une trentaine d'espèces, est localisé dans les régions tropicales du continent sud-américain et en particulier dans l'est du Brésil. Les deux groupes *Agauria* et *Agarista* affectionnent les mêmes types d'habitat : les zones de montagnes tropicales. Ceci explique la grande dispersion de *Agauria* sur le continent africain où la ceinture tropicale ne compte pas d'ensemble montagneux continu [Stevens, 1970].

Kron et Judd, en 1997, dans une étude sur la cladistique de certains genres des *Vaccinoideae*, concluent que les groupes d'espèces américaines et africaines forment une unité phénétique et phylogénétique et doivent être considérés comme un seul genre : *Agarista*. Les espèces américaines d'*Agarista* sont placées dans la section *Agarista* et les espèces africaines dans la section *Agauria* [Kron et Judd, 1997].

On peut reconnaître le genre *Agauria* à ses feuilles généralement entières qui sont souvent glauques sur leur face inférieure et à ses inflorescences en grappe portant des fleurs quelque peu charnues, blanches à roses ou rouges [Schatz, 2001].

*Agauria salicifolia* Hook.f. ex Oliver est une espèce d'Afrique centrale, d'Afrique du sud et de Madagascar, répandue dans les forêts et prairies des hauts plateaux (1 300 - 3 000 m d'altitude) (figure II 12). C'est un des bois pionniers des coulées de lave. A Madagascar, cette espèce a pour noms vernaculaires *Angavodiana*, *Avogandia*, *Ankavodiana*, *Angavodianandrano*, *Aavodiana*, *Kavodia* et *Bois de rempart* ou *Bois de gale* à La Réunion.

Cette espèce est décrite dans la flore des Mascareignes :

*A. salicifolia* Hook.f. ex Oliver : Arbuste ou arbre (souvent petit arbre tortueux) d'environ 10-20 m de haut à tiges ramifiées et à bourgeons foliaires de couleur rougeâtre. L'écorce est grisâtre fissurée en long. Le bois de cœur est rougeâtre. Les feuilles sont à nervure principale saillante, très denses au sommet des rameaux, les jeunes feuilles sont rougeâtres. Le limbe est coriace elliptique ou lancéolé, acuminé au sommet, tomenteux à l'état jeune. La marge foliaire est repliée vers le dessous. L'inflorescence est en grappe de fleurs en clochettes crème à rouges, terminales ou axillaires pluriflores. Les fruits capsulaires portent de petites graines dispersées par le vent [Bosser *et al.*, 1981].



**Figure II 12. Rameau fleuri d'*A. salicifolia* (source : Site Internet de la banque de données Prelude : utilisation de plantes en médecine traditionnelle vétérinaire et humaine en Afrique sub-saharienne).**

Le très grand polymorphisme de cette espèce a été souligné par de nombreux botanistes lors de sa découverte aussi bien par H. Perrier de la Bâthie à Madagascar, que par Baker à l'île Maurice et par J. de Cordemoy à la Réunion [Bosser *et al.*, 1981].

De nombreuses publications font état d'*A. salicifolia* var. *salicifolia* originaire de l'île Maurice et qui y porte le nom de *Bois cabri* [Ewane-Nyambi *et al.*, 1993b].

En Afrique centrale, la sève des feuilles coupées d'*A. salicifolia* ou *A. salicifolia* var. *salicifolia* est appliquée sur les plaies causées par les scarifications. Les feuilles ont des propriétés analgésiques. La plante est également utilisée comme insecticide et comme antidote contre les flèches empoisonnées. L'écorce broyée est additionnée d'eau fraîche puis bue au Kenya par les Massaï comme aide à la

digestion ou après un excès de viande [Burkill, 1994]. A Madagascar, la plante grillée est réduite en poudre et appliquée sur les plaies ulcéreuses [Boiteau *et al.*, 1959]. Elle est également utilisée pour traiter la syphilis et les névralgies. En usage externe, les feuilles sont également utilisées comme traitement contre la gale.

Les feuilles sont mortellement toxiques pour les hommes et le bétail, même les feuilles mortes peuvent provoquer vomissements, convulsions, difficultés respiratoires et comas. Les racines sont également toxiques [Loriaux *et al.*, 1973].

En 2005, Martinet *et al.* ont rapporté le cas d'un empoisonnement par *A. salicifolia*. Une femme qui avait consommé par erreur cette plante en infusion a été sujette à des vomissements, une hypotension artérielle et une bradycardie et a guéri en quelques heures sous surveillance médicale [Martinet *et al.*, 2005].

*Agauria polyphylla* Baker est une espèce endémique de Madagascar. C'est un arbre commun de la région centrale où il est appelé *Angavodiana* ou *Angavodianantany* (figure II 13).



**Figure II 13.** *Agauria polyphylla* (source : Laboratoires Bayer Consumer Care division Serdex)

La description botanique de cette espèce se trouvant dans un volume non édité de la Flore de Madagascar et des Comores n'est pas disponible. Certains botanistes considèrent *A. polyphylla* comme une simple forme adaptée à la savane et aux milieux arides d'*A. salicifolia* [Loriaux *et al.*, 1973].

Comme celles d'*A. salicifolia*, les feuilles de *A. polyphylla* sont utilisées contre les éruptions et en cas de gale, on les utilise également pour le traitement de rhumatismes et pour soigner les plaies. La plante provoque des accidents mortels sur le bétail qui en consomme les feuilles [Boiteau, 1986].

Cette plante fournit un bois de construction de qualité médiocre, utilisé dans la fabrication de charbon de bois.

### 2.3. Principaux métabolites secondaires des *Ericaceae* Juss.

**Tanins.** Les tanins sont des constituants abondants des *Ericaceae*. Les représentants de cette famille produisent des tanins galliques, des tanins ellagiques et des tanins condensés et ce, essentiellement dans les feuilles. On connaît peu de choses sur les structures exactes des tanins des *Ericaceae* cependant de nombreux éléments constitutifs des tanins (ainsi que leurs polymères) ont été isolés. Le plus répandu est l'acide gallique (30) mais on peut également citer l'acide *o*-protocatéchique (31), l'acide gentisinique (32) et le sparassol (33) ainsi que la catéchine et l'épicatéchine parmi les plus répandus (figure II 14) [Hegnauer, 1966 ; Hegnauer, 1989].

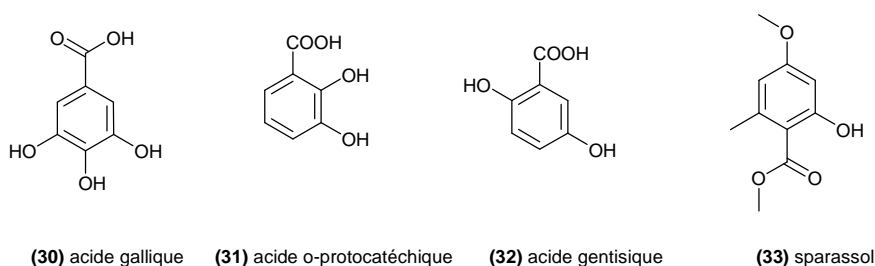


Figure II 14. Structures de base des tanins des *Ericaceae*.

**Flavonoïdes.** Les composés flavonoïdiques sont largement répandus dans les feuilles et les fleurs d'*Ericaceae*. Ce sont surtout des flavonols, dérivés *O*-glycosylés de quercétine (34) mais aussi de kaempférol et de myricétine. Quelques genres (*Pieris*, *Kalmia*) produisent des flavanones et des dihydrochalcones à la place des flavonols ((39) à (42)).

Les pigments rouges et bleus des fleurs et fruits d'*Ericaceae* sont des anthocyanes et des flavanones. Ils ont été principalement étudiés dans le genre *Rhododendron* dont deux flavones sont caractéristiques : l'azaléine (37) et la 5'-hydroxyazaléine (figure II 15) [Hegnauer, 1966].

**Autres dérivés phénols et hétérosides phénoliques.** Certains hétérosides phénoliques sont caractéristiques des *Ericaceae* (figure II 16). On peut citer les dérivés de diphenols qui sont représentés par l'arbutine (48) et ses dérivés, méthylarbutine (49), homoarbutine (50) et pyroside (51). Les feuilles de busserole (*Arctostaphylos uva-ursi* Spreng) contiennent 6-10 % d'arbutine qui, par hydrolyse, libère un diphenol qui s'oxyde immédiatement en hydroquinone. Cette plante, citée dans la Pharmacopée européenne est utilisée pour le traitement des infections des voies urinaires [Bruneton, 1999]. Les genres *Chimaphila* et *Rhododendron* sont connus pour produire, en plus de l'arbutine, des composés caractéristiques : la pyrolatine (52) et la chimaphiline (53) (figure II 16). D'autres hétérosides phénoliques, comme le monotropitoside (54) (ou gaulthérine) ont été caractérisés dans les genres *Gaultheria* ou *Monotropa*. Le genre *Rhododendron* produit des dérivés phénoliques (par exemple le rhododendrol (55)) qui sont le plus souvent monoglycosylés ; c'est le cas de la



rhododendrine (**56**). Quelques lignanes dont le lyonoside (**57**) ont été identifiés dans le genre *Lyonia* [Hegnauer, 1989].

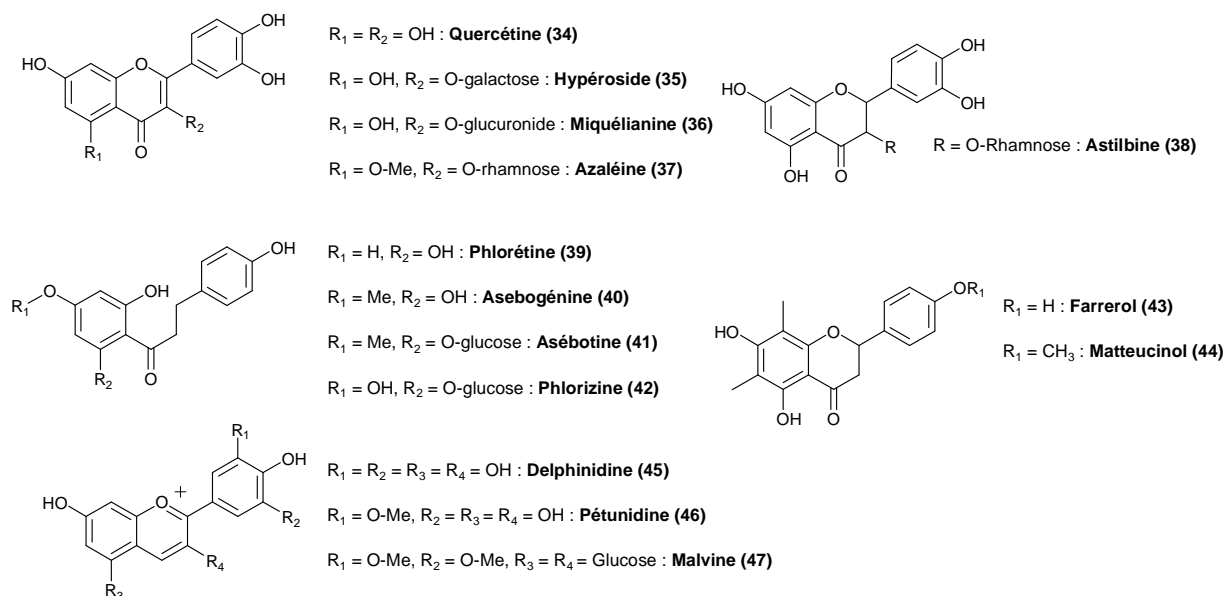


Figure II 15. Flavonoïdes communs isolés des *Ericaceae* d'après [Hegnauer, 1966]

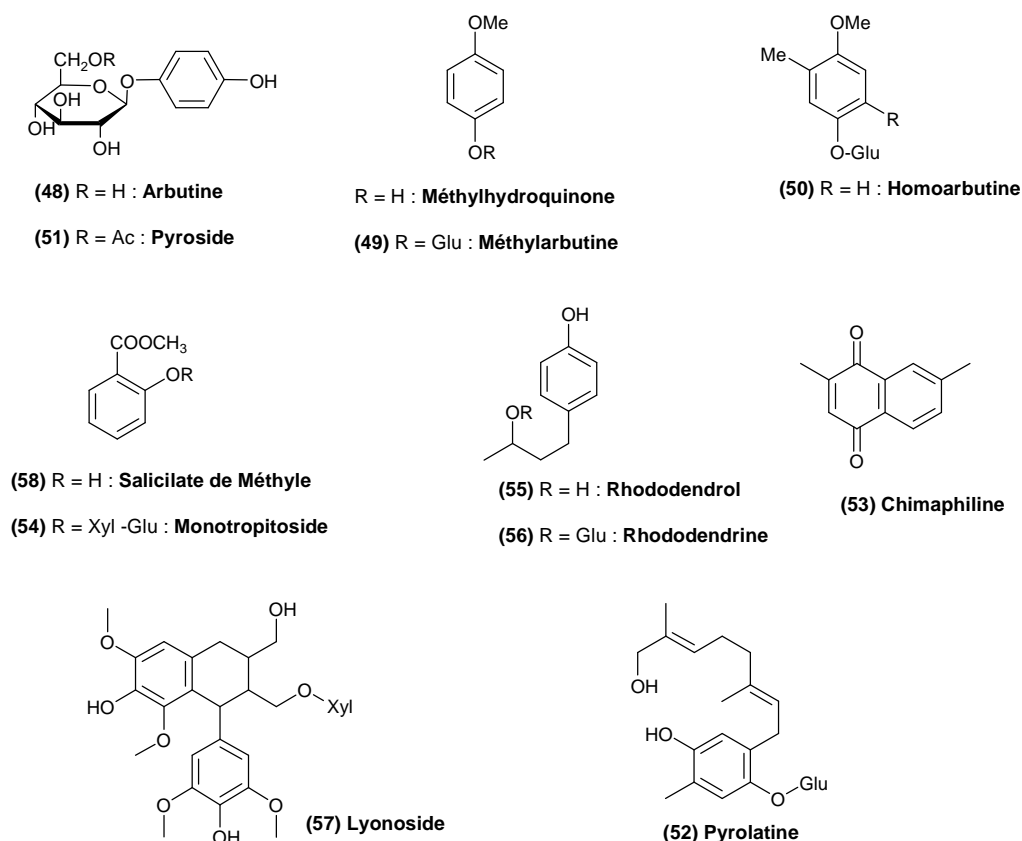


Figure II 16. Hétérosides phénoliques et dérivés quinoniques caractéristiques des *Ericaceae* d'après Hegnauer [Hegnauer, 1989].

**Huiles essentielles.** Le genre des *Ericaceae* le plus étudié pour son huile essentielle est le genre *Ledum* avec pour composants majoritaires le pinène (**28**), le bornéol (**59**), l' $\alpha$ -phellandrène (**60**), l' $\alpha$ -

caryophyllène (61) et le carvacrol (62) [Hegnauer, 1966] (figure II 17). Le salicylate de méthyle (58) est le composant principal de l'essence de Wintergreen, huile essentielle obtenue d'un arbuste nord-américain, *Gaultheria procumbens* L., dans laquelle il existe sous la forme de monotropitoside (figure II 16) [Bruneton, 1999].

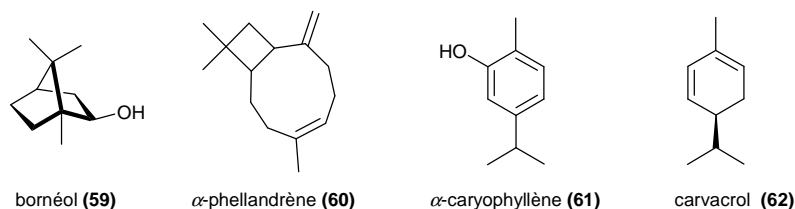


Figure II 17. Composants majoritaires des huiles essentielles du genre *Ledum* [Hegnauer, 1966].

**Diterpènes toxiques.** Des diterpènes ont été isolés en très grand nombre dans certains genres *Rhododendron*, *Lyonia*, *Leucothoe*, *Pieris* et *Agauria* et leur confèrent leurs propriétés toxiques. Quelques exemples de ces diterpènes d'*Ericaceae* sont présentés figure II 18 [Hegnauer, 1966 ; Hegnauer, 1989].

Ces molécules, présentes dans le pollen des fleurs de *Rhododendron* et *Kalmia* par exemple, peuvent passer dans le miel élaboré à partir de ces plantes et sont à l'origine de nombreuses intoxications notamment en Turquie [Scott *et al.*, 1971 ; Bruneton, 1999].

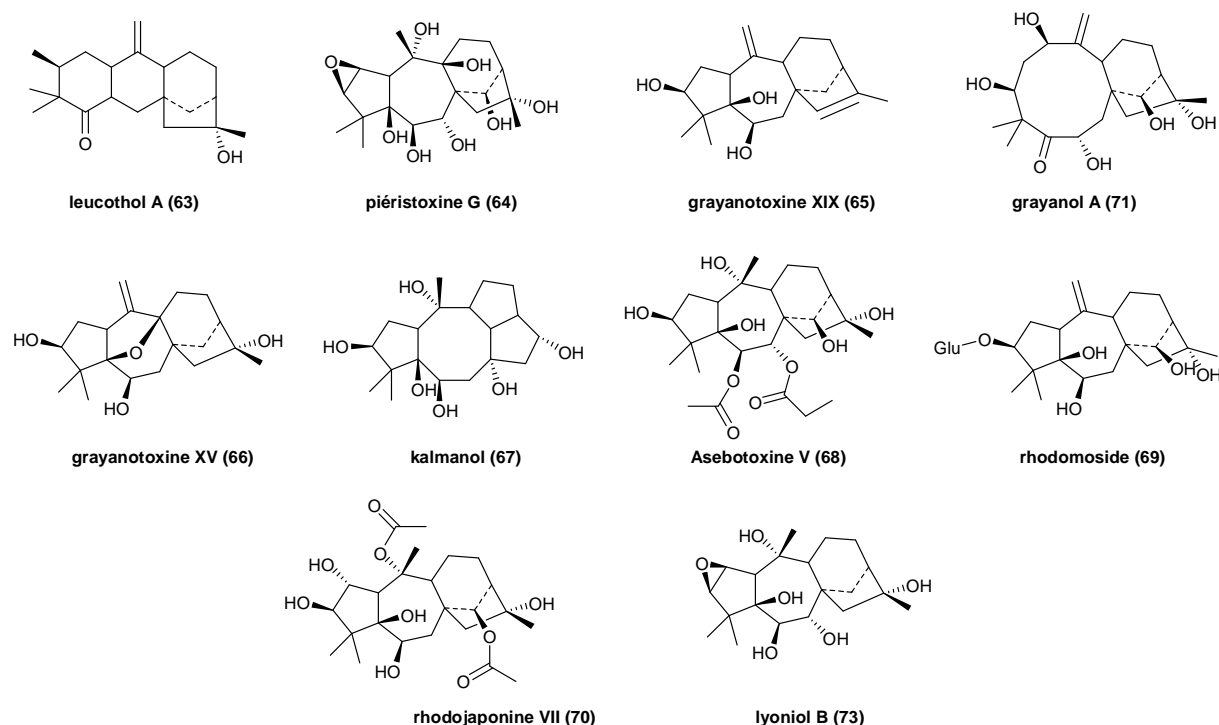


Figure II 18. Quelques exemples de molécules diterpéniques isolées d'*Ericaceae* d'après Hegnauer [Hegnauer, 1966 ; Hegnauer, 1989].

**Triterpènes.** L'acide ursolique (74), le taraxérol (75), la  $\beta$ -amyrine (76), le  $\beta$ -sitostérol (77), la friedéline (78) et le lupéol (79) sont les triterpènes les plus fréquemment cités dans la littérature pour les *Ericaceae* (figure II 19). L'acide ursolique, considéré comme caractéristique des *Ericaceae*, a ensuite été découvert dans de nombreuses autres familles [Hegnauer, 1966].

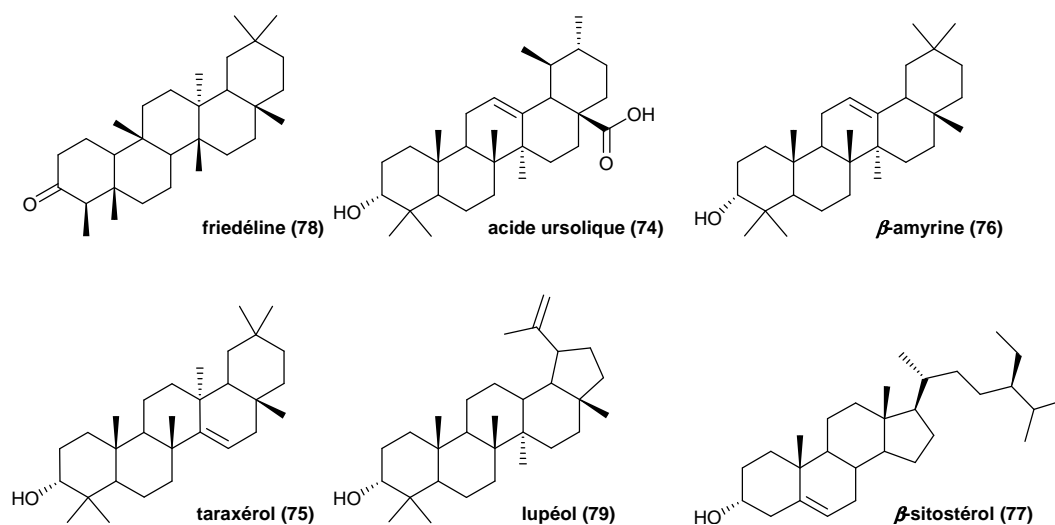


Figure II 19. Triterpènes fréquents dans les *Ericaceae* d'après Hegnauer [Hegnauer, 1966 ; Hegnauer, 1989].

## 2.4. Travaux antérieurs sur le genre *Agauria*

Les travaux de Sosa et Dussy, en 1951, sur *Agauria salicifolia*, ont permis de montrer que les feuilles et l'écorce contiennent d'abondantes quantités de tanins catéchiques et d'isoler des extraits alcooliques d'écorce huit substances triterpéniques que ces auteurs ont nommées : agaurool A, agaurool B, agaurool C, agaurool D, agaurool  $\alpha$ , agaurool  $\beta$ , agauriolol et acide agauriolique [Dussy et Sosa, 1951]. L'identification de l'époque n'avait abouti qu'à des hypothèses quant à la formule brute de ces composés. Ils montrèrent un peu plus tard que l'acide agauriolique est en fait l'acide morolique (80) [Sosa et Dussy, 1951].

En 1959, Boiteau *et al.* ont étudié *A. salicifolia* et plus particulièrement une forme considérée comme la plus toxique de cette espèce pour en trouver le principe actif toxique. En effet l'action curarisante de cet arbuste a été mise en évidence en 1911 par Radais et Sartory par injection intra péritonéale d'extrait alcoolique à des rats leur provoquant une paralysie complète du train postérieur, des tremblements et convulsions et une dyspnée intense précédant la mort. Boiteau *et al.* ont ainsi isolé de l'acide acétylmorolique (81) et les agauriols et agaurools précédemment isolés ainsi qu'un acide triterpénique dicarboxylique nommé acide agaurique et dont « l'agaurate double de glucose et de sodium » serait responsable de l'action curarisante d'*A. salicifolia* [Boiteau *et al.*, 1959].

En 1973, Loriaux *et al.* ont isolé et identifié, des feuilles de *Agauria polyphylla* cette fois, trois diterpènes : les grayanotoxine I (82), grayanotoxine II (83) et grayanotoxine III (84). Pour ces auteurs, ces composés sont responsables de la toxicité de cette plante et leur teneur est inférieur à 50 mg/kg de feuilles sèches [Loriaux *et al.*, 1973].

Grégoire et Nyembo ont ensuite contribué à l'étude de l'espèce variable *A. salicifolia* en étudiant un lot d'*A. salicifolia* var. *salicifolia* du Zaïre. Des extraits d'écorces sèches, ils ont isolé des triterpènes qui sont l'acide acétyl-3-morolique (85), le  $\beta$ -sitostérol (77), l'acétyl-3-moradiol (86), le taraxérol (75), l'agauriastérone (87), la taraxérone (88) et l'acétyl-4-moraldéhyde (89). Ces auteurs mentionnent qu'ils n'ont pas retrouvé les substances inconnues qui accompagnaient l'acide acétyl-3-morolique dans les précédentes études sur *A. salicifolia* [Grégoire et Nyembo, 1977].

Comme les grayanotoxines étaient présumées responsables des effets curarisants des *Agauria*, Ewane-Nyambi *et al.* ont étudié les effets d'extraits de feuilles d'*A. salicifolia* sur la perméabilité au sodium de cellules isolées de muscles squelettiques et cardiaques de grenouilles. Ils ont montré que l'extrait exerce un effet antagoniste sur les canaux sodium en agissant sur un seul site qui est différent du site habituel d'inhibition [Ewane-Nyambi *et al.*, 1993b ; Ewane-Nyambi et Raymond, 1993]. Cet effet inhibiteur ne serait pas dû aux seules grayanotoxines [Ewane-Nyambi *et al.*, 1993a].

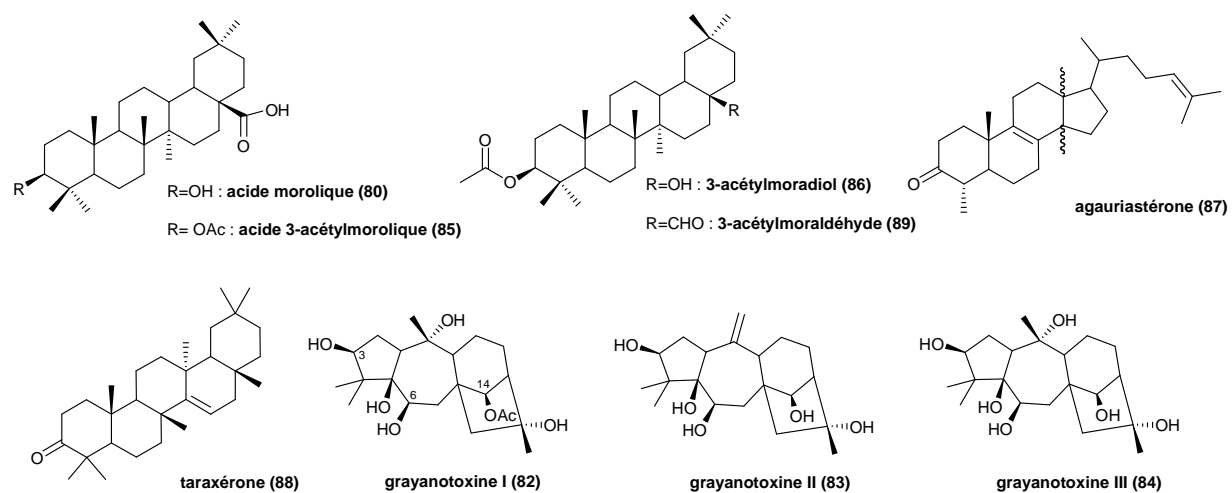


Figure II 20. Molécules isolées du genre *Agauria* [Boiteau *et al.*, 1959 ; Loriaux *et al.*, 1973 ; Grégoire et Nyembo, 1977].

### 3. Présentation de *Embelia concinna* Baker (*Myrsinaceae*)

#### 3.1. La famille des *Myrsinaceae* R. Brown

Famille comprenant environ un millier d'espèces [Perrier de la Bâthie et Humbert, 1953], les *Myrsinaceae* ont une distribution mondiale s'étendant au nord jusqu'au Japon, au Mexique et au nord de la Floride et au sud jusqu'en Afrique du Sud et en Nouvelle Zélande [Watson et Dallwitz, 1992]. Les genres herbacés sont distribués principalement dans les régions tempérées (chaudes) alors que les genres arborescents ou ligneux sont essentiellement tropicaux. Les genres principaux, *Ardisia* et *Rapanea* sont pantropicaux, occupant tant les basses terres que les zones montagneuses [Stahl et Anderberg, 2004].

**Position systématique.** Les trois familles *Theophrastaceae*, *Primulaceae* et, la plus grande des trois, *Myrsinaceae*, généralement traitées comme appartenant aux *Primulales* dans les classifications anciennes (tableau II 5) forment un petit groupe reclassé dans l'ordre des *Ericales*, un des principaux clade de la sous-classe des *Asteridae* [APG, 1998] (voir figure II 10 page 23).

Ces familles sont considérées comme formant un groupe monophylétique par les analyses cladistiques morphologiques ainsi qu'au niveau des données moléculaires mais un réalignement taxonomique au sein de ce groupe a été mené par Kallersjo *et al.* en 2000. Les interrelations phylogénétiques de *Primulaceae*, *Myrsinaceae* et *Theophrastaceae* ont été étudiées au travers des séquences de gènes chloroplastiques. Il en a résulté l'élévation du genre *Maesa* (anciennement appartenant aux *Myrsinaceae*) au rang de famille : les *Maesaceae* et de nombreux transferts pour rendre les familles monophylétiques (les genres *Lysimachia*, *Anagallis*, *Glaux*, *Asterolinon*, *Coris*, *Ardisiandra* et *Cyclamen* et *Pelletiera* ont été déplacés chez les *Myrsinaceae*) [Kallersjo *et al.*, 2000].

La délimitation actuelle des *Myrsinaceae* est due à Stahl et Andenberg : les *Myrsinaceae* comptent un millier d'espèces réparties dans 49 genres sans autre subdivision infrafamiliale [Stahl et Anderberg, 2004].

Tableau II 5. Taxonomie des *Myrsinaceae* selon Cronquist [Cronquist, 1988].

	<i>Plantae, Tracheobionta</i>
Embranchement :	<i>Spermatophyta</i>
Sous-Embranchement :	<i>Angiospermae</i>
Classe :	<i>Magnolopsida</i>
Sous-classe :	<i>Dilleniideae</i>
Ordre :	<i>Primulales</i>
Famille :	<i>Myrsinaceae</i>

**Caractéristiques botaniques des *Myrsinaceae*.** Les *Myrsinaceae* sont des arbres ou arbustes, parfois grimpants, presque toujours à feuillage persistant (certains genres peuvent être herbacés). Les

fleurs et les feuilles ont un aspect charnu et brillant. Les feuilles sont alternes, simples, entières ou dentées, coriaces, sans stipules et souvent groupées au sommet du rameau. Le limbe est marqué de cellules sécrétrices (poches schyzogènes) plus ou moins apparentes en forme de petits bâtonnets ou de ponctuations glanduleuses obscures (linéoles) également présentes sur les autres organes. L'inflorescence peut être cymeuse, racémeuse ou paniculée, parfois ramiflore. La fleur, gamopétale, tétra- ou pentamère, est actinomorphe, hypogyne, bisexuée. Ses sépales sont plus ou moins soudés et les pétales, soudés en entonnoir ou libres. L'androcée est isostémone opposipétale, les étamines à filets courts sont plus ou moins unies à la corolle, parfois soudés en tube ; les anthères sont souvent sagittées et connées et à déhiscence introrse, longitudinale ou plus rarement par pores apicaux. L'ovaire supère est uniloculaire et présente de nombreux ovules. Le fruit peut être une baie ou une drupe avec généralement une petite graine noire à albumen huileux [Perrier de la Bâthie et Humbert, 1953 ; Spichiger *et al.*, 2000].

**Utilisations traditionnelles des *Myrsinaceae*.** Certains genres de *Myrsinaceae* (*Ardisia* ou *Cyclamen*) sont cultivés comme plantes ornementales. Le feuillage persistant de certaines espèces d'*Ardisia* est apprécié au Japon où de nombreux cultivars ont été mis au point [Kobayashi et de Mejia, 2005]. Certaines espèces de *Myrsinaceae* sont comestibles (baies de *Ardisia elliptica* Thunb. ou *A. macrocarpa* Wall.) mais c'est surtout pour ses applications médicales que cette famille est connue. En Inde et en Afrique, les *Myrsinaceae* sont largement utilisées en médecine traditionnelle en tant que remèdes anthelminthiques et antibactériens [Ogweni Midiwo *et al.*, 2002]. Plus sporadiquement, leurs propriétés médicales traditionnelles incluent le traitement de diarrhées, de cancers, d'hépatites, de rhumatismes, de la tuberculose, des démences ou de certaines affections virales [Burkill, 1994].

### 3.2. Genre *Embelia* Burm. f. et *E. concinna* Baker

Le genre *Embelia* Burm. f. comprend une trentaine d'espèces dont l'aire s'étend de l'Afrique au Pacifique. Les 8 espèces présentes à Madagascar sont toutes endémiques [Perrier de la Bâthie et Humbert, 1953].

Les *Embelia* sont utilisées par l'homme en médecine traditionnelle. *Embelia ribes* Burm.f. est connue en médecine ayurvédique ancienne pour ses propriétés contraceptives [Chaudhury *et al.*, 2001 ; Kumara Swamy *et al.*, 2007]. Les fruits de cette plante ont également des propriétés carminatives, stomachiques, anti-diarrhéiques et anthelminthiques [Prashanth *et al.*, 2001]. Cette dernière propriété est partagée par de nombreuses espèces d'*Embelia*.

Les fruits de *E. schimperi* Vatke constituent l'anthelminthique le plus populaire d'Afrique de l'Est et d'Afrique centrale, en particulier contre le ténia. Plante traditionnellement employée par les Massai de Tanzanie et du Kenya [Boegh *et al.*, 1996], on la trouve désormais facilement sur les marchés. Les activités biologiques de cette plante, confirmées par de nombreuses études, ont été recensées par Machocho *et al.* [Machocho *et al.*, 2003]. D'autres espèces comme *E. guineensis* Baker ou *E. rowlandii* Gilg, semblent partager les mêmes applications et sont des succédanées d'*E. schimperi* dans de nombreuses pharmacopées traditionnelles [Burkill, 1994]. *E. angustifolia* A.DC. est utilisée à La Réunion dans le traitement traditionnel des désordres urinaires, des néphrites, des cystites et des rhumatismes [Lund *et al.*, 1997].

*Embelia concinna* Baker est endémique de Madagascar (figure II 21) où elle porte les noms de *Tanterakala*, *Takasina*, *Kasiana*, ou encore *Sirahazo*. La plante est commune dans les forêts de cimes entre 1 200 et 2 000 m d'altitude et fleurit d'octobre à janvier.



Figure II 21. Rameau fleuri de *Embelia concinna* (source : site internet de la Faculté de Pharmacie de Greifswald).

La description botanique d'*E. concinna* se trouve dans la Flore de Madagascar et des Comores.



*E. concinna* Baker : Lianes toujours vertes, parfois, dans les lieux dénudés, arbustes à rameaux plus ou moins sarmenteux (pyromorphose). Feuilles nombreuses, densément disposées, coriaces, d'un brun sombre en herbier, à pétiole grêle (2-8 cm) ; limbe elliptique ou lancéolé (1.6-3.5 x 0.8-1.5 cm) ; par transparence, à l'état adulte opaque, à l'état jeune très petits points rouges irréguliers sur fond rougeâtre et trame peu visible de réseau « hyéroglyphorne ». Panicule terminal plus ou moins ramifié, de 1 à 5 cm de long ; axe et pédicelles portant des poils bruns et courts ; bractées étroites, égalant le tiers ou les deux tiers des pédicelles ; pédicelles de 2-3 mm de long ; petites fleurs (2.5 mm de long) quadra ou pentamères. Sépales triangulaires aigus, de moins de 1 mm, portant quelques poils à l'extérieur, manifestement ciliés, avec, au milieu, 4-5 points peu visibles. Pétales obovales, étroitement obtus, papilleux, obscurément ponctuée au milieu. Etamines plus courtes que les pétales ; anthères dorsalement ponctuées. Ovaire glabre, ovoïde ; style cylindrique, de 1 mm ; stigmate discoïde, presque deux fois plus large que le sommet du style [Perrier de la Bâthie et Humbert, 1953].



Figure II 22. Feuilles de *Embelia concinna* (source : Laboratoires Bayer Consumer Care division Serdex).

Deux sous-espèces sont également présentes à Madagascar : *E. concinna* var *sclerophylla* H. Perrier différant par des feuilles encore plus coriaces et des inflorescences en grappe simple et *E. concinna* var *ericophila* H. Perrier, forme altitudinaire à feuilles très petites [Perrier de la Bâthie et Humbert, 1953].

*E. concinna* possède des propriétés anthelminthiques, ténifuges et antihémorragiques traditionnellement utilisées par les populations malgaches [Heitz et Billet, 1973].

### 3.3. Principaux métabolites secondaires des *Myrsinaceae*

Les benzoquinones de type embéline et les saponosides constituent les caractéristiques phytochimiques de la famille de *Myrsinaceae*.

**Benzoquinones.** Les benzoquinones constituent un trait caractéristique de la famille des *Myrsinaceae*. Parmi les plus fréquemment rencontrées (voir figure II 23), citons l'embéline (90), la rapanone (91) et la vilangine (92) que l'on retrouve *quasi* systématiquement dans les genres les plus étudiés : *Ardisia*, *Rapanea*, *Myrsine*, *Aegiceras* et *Embelia*. Ces composés sont présents dans les feuilles, l'écorce, mais surtout dans les fruits et le bois des *Myrsinaceae* [Hegnauer, 1969].

Les benzoquinones sont des composés anti-appétants, antimicrobiens, acaricides, insecticides et nématocides et sont souvent les principes actifs des *Myrsinaceae* qui présentent ce type d'activités. L'embéline est souvent considérée comme le principe actif des espèces anthelminthique [Ogweni Midiwo *et al.*, 2002].

Certains genres (*Rapanea*, *Ardisia*) peuvent également renfermer des alkyl-résorcinols ou des alkenyl-résorcinols qui sont probablement des précurseurs des benzoquinones [Hegnauer, 1990 ; Kozubek et Tyman, 1999].

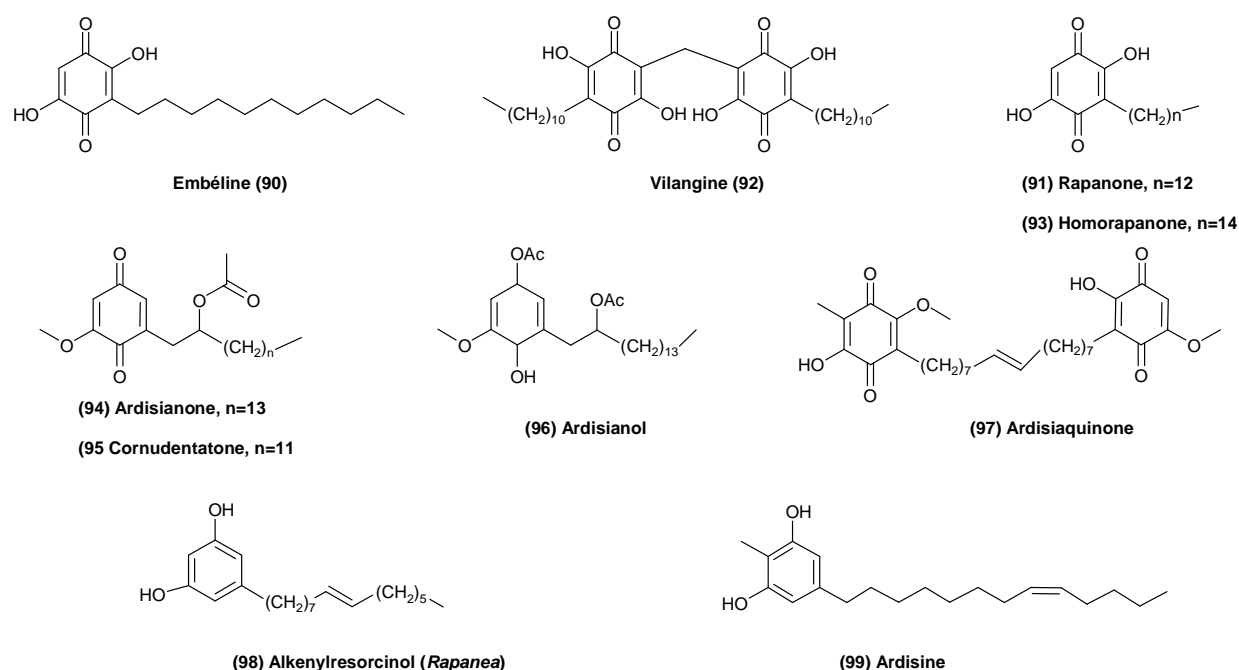


Figure II 23. Quelques exemples de benzoquinones et alkenylrésorcinols isolés de *Myrsinaceae* [Hegnauer, 1969 ; Hegnauer, 1990].

**Saponosides triterpéniques et triterpènes sensu stricto.** Comme les autres familles appartenant anciennement aux *Primulales*, la plupart des *Myrsinaceae* produisent des saponosides au niveau des racines, des branches, des feuilles et des graines [Stahl et Anderberg, 2004].

Plus d'une centaine de composés de ce type ont été extraits des genres les plus étudiés des *Myrsinaceae* : *Ardisia*, *Myrsine*, *Rapanea* et *Embelia* [DNP, 2006]. Quelques exemples de triterpènes (qui peuvent se trouver sous forme libre ou en tant que génines des saponosides) et de saponosides, isolés d'espèces de *Myrsinaceae*, sont présentés sur la figure II 24.

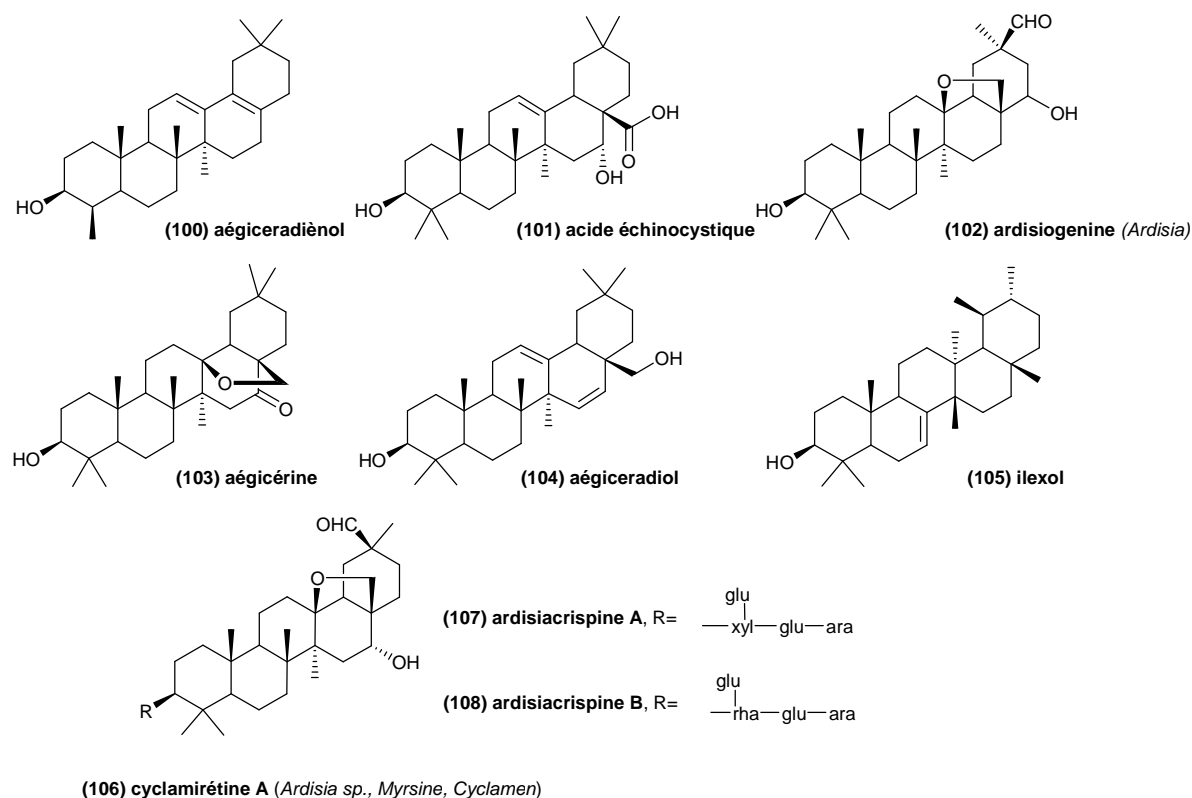


Figure II 24. Exemples de triterpènes et saponosides des *Myrsinaceae* [DNP, 2006].

**Autres substances.** Peu de publications font état des types de phénols que l'on peut trouver dans les *Myrsinaceae*. Les principales génines de flavonoïdes décrites pour cette famille sont principalement les classiques myricétine (109), quercétine, leucocyanidine (110), leucidelphinidine (111) ou cyanidine (112). Le genre *Ardisia* produit également de l'acide ardisique B (113) ou bergénine [Hegnauer, 1969 ; Hegnauer, 1990]. Le genre *Myrsine* produit des acides terpéno-benzoïques appelés acides myrsinoïques ((114) à (117)) aux propriétés anti-inflammatoires (figure II 25) [Hirota *et al.*, 2002 ; Makabe *et al.*, 2003].

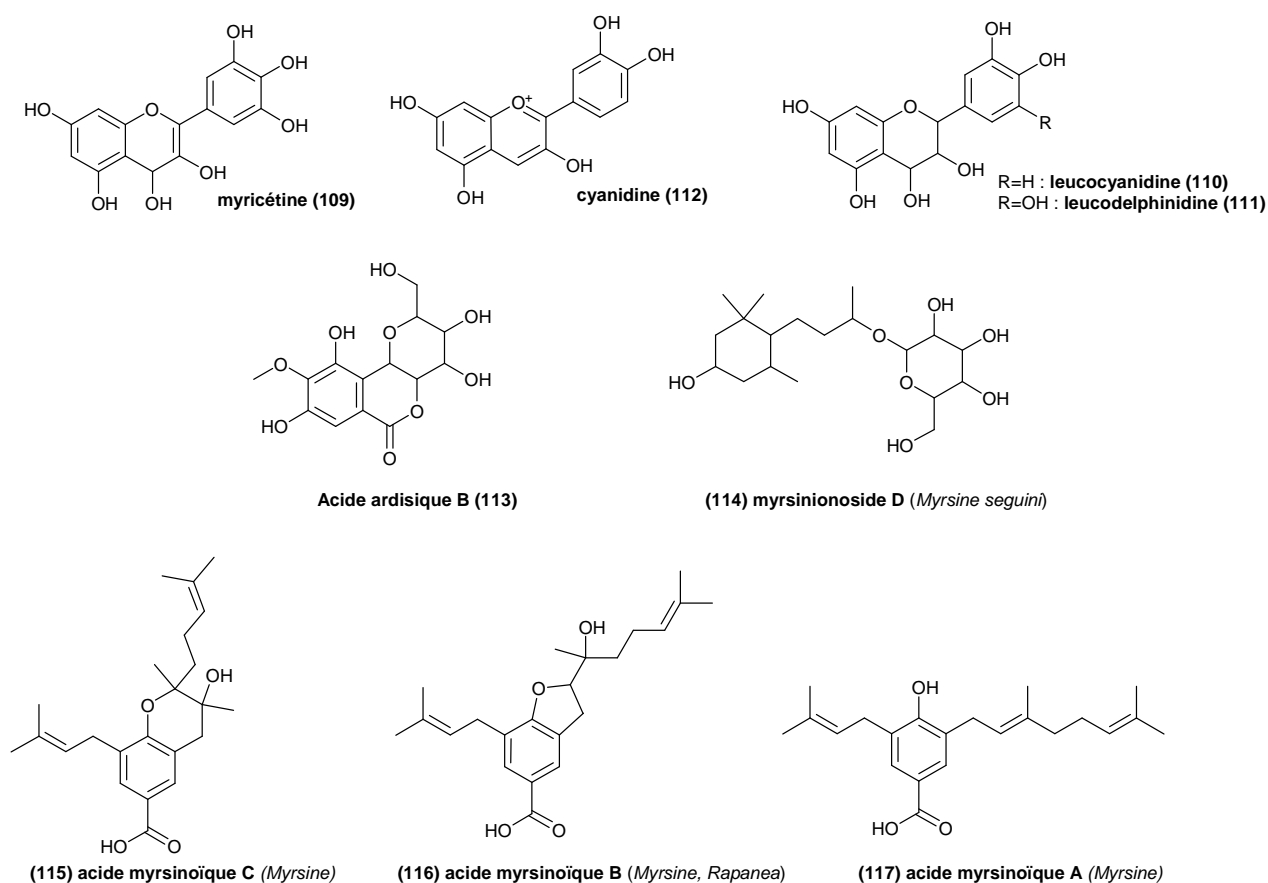


Figure II 25. Exemples de la diversité des structures observées chez les *Myrsinaceae* d'après Hegnauer et DNP [Hegnauer, 1969 ; Hegnauer, 1990 ; DNP, 2006].

### 3.4. Travaux antérieurs sur le genre *Embelia*

La composition phytochimique des plantes du genre *Embelia* est étudiée de longue date en raison de son abondante utilisation en médecine traditionnelle et de l'intérêt que cela suscite.

En 1950, la présence de stérols, de tanins, de saponines et de quinones (embéline (90)) a été mise en évidence dans *Embelia barbayena* Mez. En dépit de sa forte toxicité, cette plante est couramment utilisée comme vermifuge et purgatif [Paris et Rabenoro, 1950].

L'espèce du genre *Embelia* la plus étudiée est sans doute *E. ribes* Burm.f. pour ses propriétés contraceptives [Krishnaswamy et Purushothaman, 1980 ; Seth *et al.*, 1982]. Ces effets seraient dus à la présence d'embéline en grande quantité dans les fruits et les graines. Cette molécule a, outre ses propriétés contraceptives, des propriétés analgésiques, anti-inflammatoires, antioxydantes, anti-tumorales et antibactériennes [Chitra *et al.*, 2003]. L'embéline est également le composant majoritaire des graines de nombreuses autres espèces de *Embelia* (*E. scandens* Mez, *E. robusta* Roxb., *E. kilimandscharica* Gilg).

De nombreuses autres quinones et benzoquinones ont été isolées des *Embelia*, dont *E. angustifolia* A.DC. notamment [Haq *et al.*, 2005 ; DNP, 2006] (figure II 26).

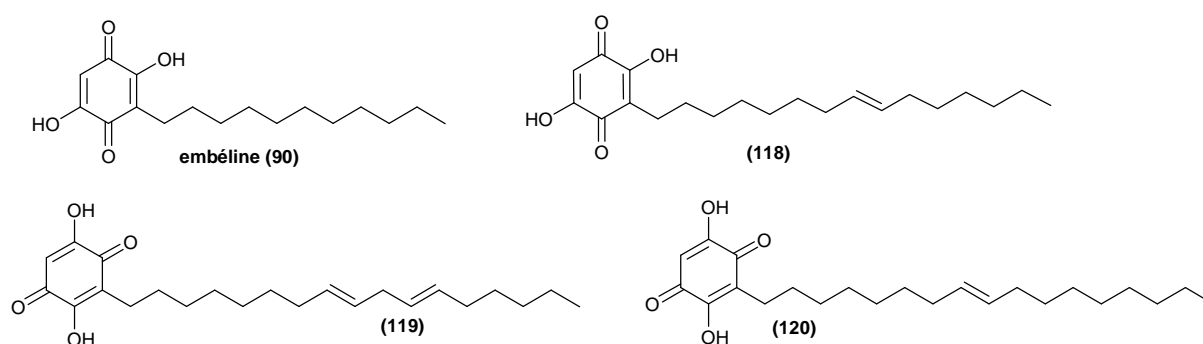
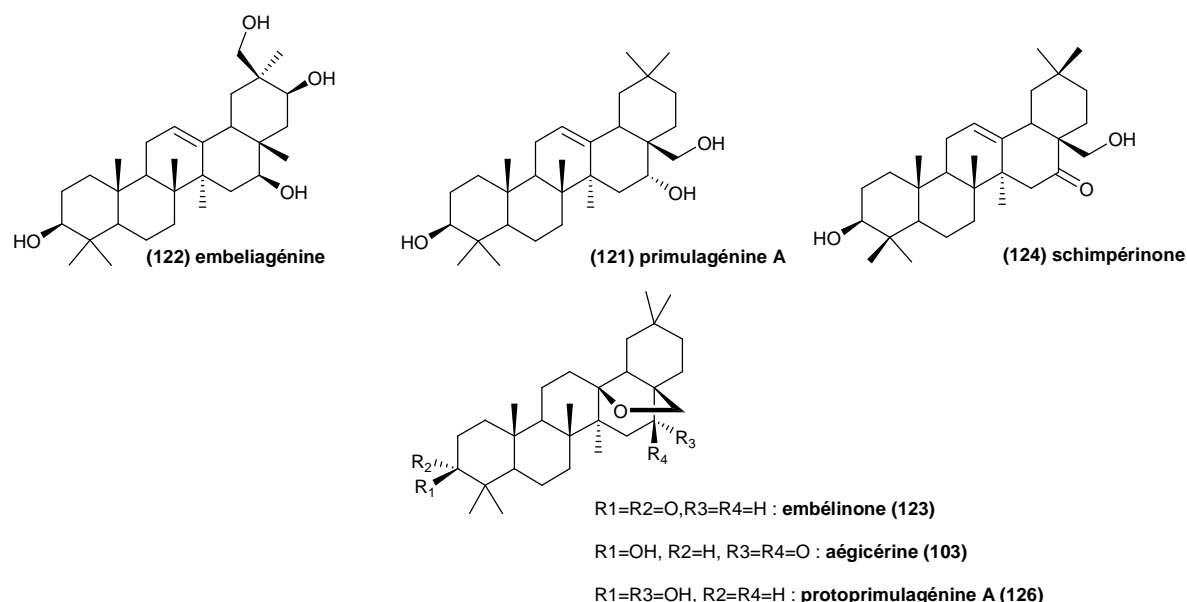


Figure II 26. Exemples de benzoquinones du genre *Embelia* [DNP, 2006].

L'étude, en 1973, d'*E. concinna* Baker par Heitz et Billet a conduit à l'identification de deux triterpènes pentacycliques : la primulagénine A (121) et l'embéliagénine (122) [Heitz et Billet, 1973].

Une autre représentante des *Embelia* très étudiée est *E. schimperi* Vatke, utilisée en médecine traditionnelle comme dépuratif et anthelminthique. L'efficacité de cette plante contre *Taenia saginata* a été confirmée par des études *in vitro* [Boegh *et al.*, 1996]. Comme les autres *Embelia*, cette plante renferme des benzoquinones substituées par de longues chaînes alkyle (de type embéline) ainsi que des anthraquinones (vilangine (92)) et des triterpènes pentacycliques (embélinone (123), schimpérinone (124), aégicérine (103), protoprimulagénine A (126) et primulagénine A (121)) (figure II 27) [Machocho *et al.*, 2003].



**Figure II 27.** Triterpènes pentacycliques isolés du genre *Embelia* [Heitz et Billet, 1973 ; Boegh *et al.*, 1996 ; Machocho *et al.*, 2003].

Des flavonols ont été isolés en grand nombre dans le genre *Embelia*, par exemple des dérivés des génines myricétine, quercétine et kaempférol : quercétine-3-*O*-rutinoside, quercétine-3-*O*-rhamnoside, quercétine-3-*O*-galactoside et quercétine-3-*O*-galactosyl(1→2)rhamnoside (*E. schimperi* Vatke) [Arot et Williams, 1997], ou de syringétine : syringétine-3-*O*-rhamnoside-7-*O*-glucoside, syringétine-3-*O*-rhamnoside-7,4'-di-*O*-glucoside et de myricétine : myricétine-3-*O*-rhamnoside, myricétine-3-*O*-glucoside, myricétine-3-*O*-rhamnosyl(1→3)galactoside, myricétine-3-*O*-glucosyl(1→2)glucoside-7-*O*-glucosyl(1→4)rhamnoside, quercétine-7-*O*-galactosyl(1→4)galactoside (des feuilles d'*E. keniensis* R.E.Fr.) [Manguro et Williams, 1996].

## 4. Flavonoïdes et spectrométrie de masse

### 4.1. Généralités sur les flavonoïdes

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. A ce jour, plus de 4000 flavonoïdes naturels ont été décrits. On estime que 2 % environ du carbone organique photosynthétisé par les plantes, soit quelques  $10^9$  tonnes par an, est converti en flavonoïdes [Agrawal et Markham, 1989].

**Chimie des flavonoïdes.** Flavonoïdes (de *flavus*, « jaune » en latin) est le terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 carbones, qui à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en  $C_6-C_3-C_6$ ). Le pont en  $C_3$  entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (figure II 28).

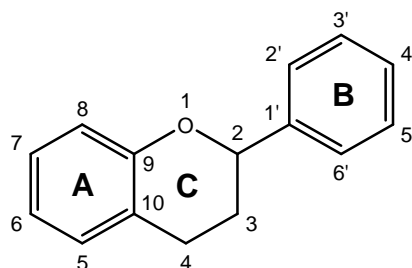
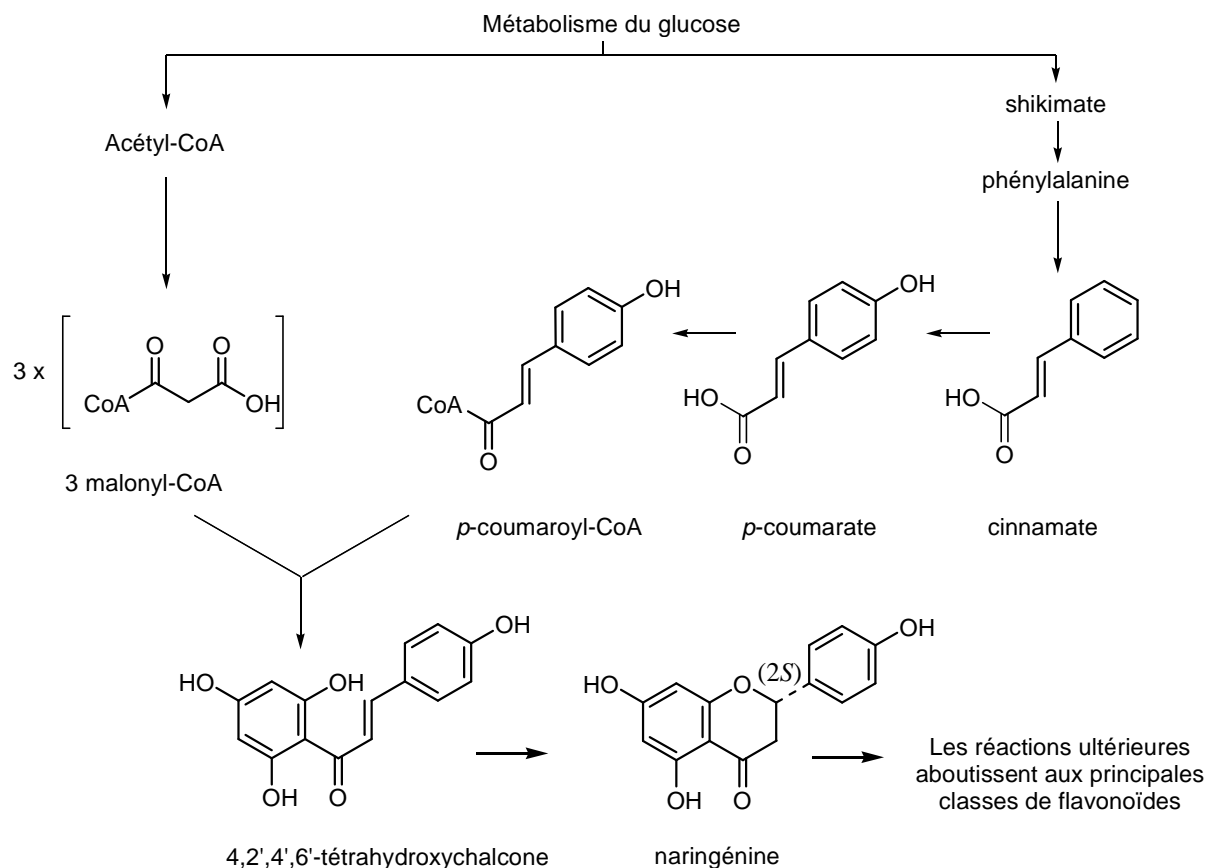


Figure II 28. Structure de base des flavonoïdes.

**Biosynthèse des flavonoïdes.** Les flavonoïdes possèdent tous le même élément structural de base car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune. Le cycle A est formé à partir de trois molécules de malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA), issues du métabolisme du glucose. Les cycles B et C proviennent eux aussi du métabolisme du glucose mais par la voie du shikimate via la phénylalanine qui est convertie en *p*-coumarate puis en *p*-coumaroyl-CoA (figure II 29).

Le *p*-coumaroyl-CoA et les 3 malonyls-CoA se condensent en une seule étape enzymatique pour former une chalcone, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone (réaction catalysée par la chalcone synthétase). Le cycle C se forme par cyclisation de la chalcone, réaction catalysée par la chalcone-isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à une seule 2(*S*)-flavanone : la naringénine. Ce cycle s'hydrate ensuite pour former les différentes classes de flavonoïdes [Heller et Forkmann, 1993].



**Figure II 29.** Schéma de la biosynthèse des flavonoïdes illustrant les voies de l'acétyle CoA et de la phénylalanine d'après Heller et Forkmann [Heller et Forkmann, 1993].

**Classes de flavonoïdes.** Les diverses classes de flavonoïdes diffèrent en fonction de la cyclisation et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C alors que les composés individuels au sein d'une classe diffèrent par la substitution des cycles A et B. Parmi les nombreuses classes de flavonoïdes présentées figure II 30, nous citerons les principales : anthocyanes, flavanols, flavones, flavanones, isoflavones et proanthocyanidols [Harborne, 1988].

Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme C- ou O-glycosylés ; les formes libres, sans sucres attachés, sont appelées génines. Les O-glycosides, de loin les plus fréquents, portent leurs substituants sur les groupements hydroxyles de la génine, alors que pour les C-glycosides, la liaison se fait directement avec un carbone de la génine, les C-6 et/ou C-8. En effet, la formation de la (ou des) liaison(s) hétérosidique(s) est sous la dépendance de transférases très spécifiques quant au substrat et à la position d'osylation [Bruneton, 1999].



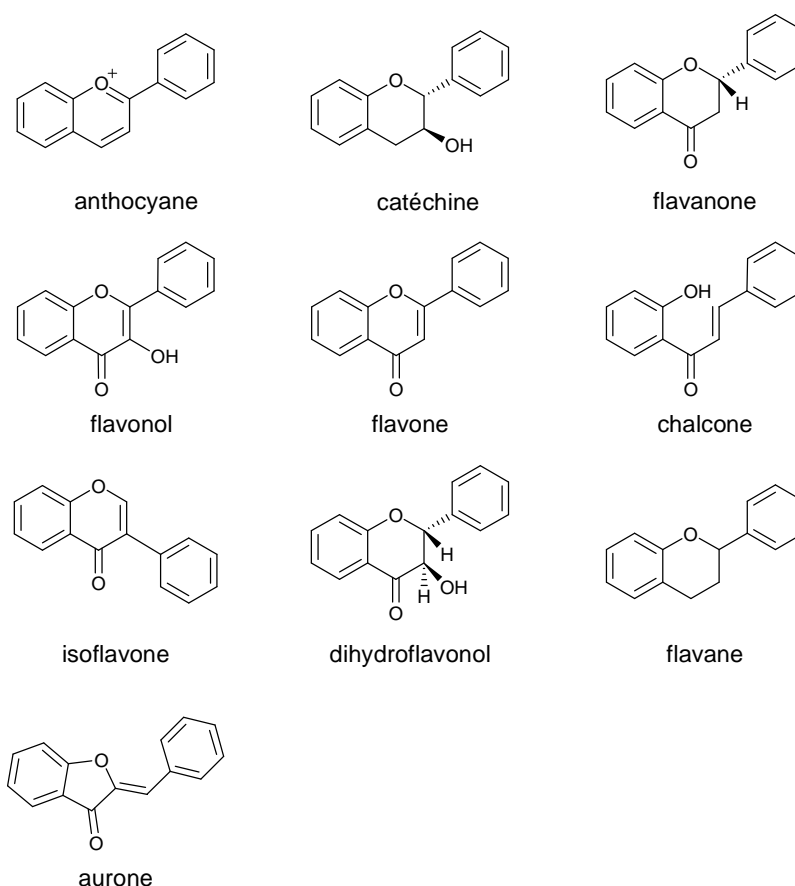


Figure II 30. Les diverses classes de flavonoïdes d'après Bruneton [Bruneton, 1999].

Plus de 80 sucres différents ont été trouvés liés aux flavonoïdes des plantes. Parmi eux, le D-glucose est de loin le monosaccharide le plus courant, d'autres hexoses, le D-galactose et le D-mannose, ainsi que des pentoses, le D-xylose, le L-arabinose et le D-apirose sont fréquents avec le L-rhamnose (seul désoxyhexose) et des acides uroniques (le plus souvent l'acide D-glucuronique). On trouve également des disaccharides (une quarantaine dont les plus courants : le rutinose et le néohesperidose), des trisaccharides (environ 30 espèces) et quelques rares tétrasaccharides. Les sucres peuvent à leur tour être substitués par des groupements acyles tels que le malonate ou l'acétate [Hollman et Arts, 2000].

**Distribution dans les plantes et le règne végétal.** A de rares exceptions près<sup>2</sup>, seules les plantes ont la capacité de biosynthétiser des flavonoïdes. Les flavonoïdes peuvent être présents dans toutes les parties des plantes. Dans la majorité des cas, les flavonoïdes sont présents sous forme glycosylée dans les plantes car la glycosylation a pour effet de les rendre moins réactifs et plus hydrosolubles permettant alors leur stockage dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs, de l'épiderme et du mésophylle des feuilles, des parenchymes des tiges et racines [Bruneton, 1999]. Les génines seules sont présentes dans les exsudats farineux de certaines plantes, dans les cuticules des feuilles, écorces et bourgeons ou sous forme de cristaux dans les cellules de certaines *Cactaceae* et plantes de régions arides [Iwashina, 2000]. Il est à noter que flavanones et flavones sont souvent

<sup>2</sup> Quelques flavonoïdes ont été isolés d'un corail marin et d'un petit nombre de champignons [Iwashina, 2000].

présentes dans la même plante. Flavones et flavonols ne se trouvent généralement pas ensemble, pas plus que flavanols et anthocyanes [Merken et Beecher, 2000].

La présence de composés flavonoïdiques a été rapportée chez les Bryophytes, les Ptéridophytes, les Gymnospermes et chez les Angiospermes [Markham, 1988]. Cette distribution *quasi* ubiquitaire dans les plantes, alliée à leur relative stabilité, leur relative facilité d'identification et la forte tendance des plantes taxonomiquement proches à produire les mêmes types de flavonoïdes, ont fait des flavonoïdes des marqueurs chimiotaxonomiques de choix pour la classification végétale [Cooper-Driver et Bhattacharya, 1998 ; Grayer *et al.*, 1999].

**Rôle dans les plantes.** Les flavonoïdes sont les pigments colorés des fleurs. Par exemple, les couleurs orange, rouges et bleues des légumes, fruits, fleurs et tissus de stockage des plantes sont dues à des anthocyanes hydrosolubles (qui sont des flavonoïdes jaunes réduits). De ce fait, ils jouent un rôle important dans les interactions avec les insectes (attraction et rôle dans la pollinisation entomophile et la dispersion des graines).

Ils sont impliqués dans les interactions plantes-microorganismes : dans les pathogénèses comme dans les symbioses (nodules des légumineuses). Ils agissent dans les systèmes de défense des cellules végétales en réponses à certains stress tels que les radiations ultraviolettes. Ce sont également des inhibiteurs d'enzymes, des agents chélatants des métaux nocifs aux plantes. De plus ils sont impliqués dans la photosensibilisation et les transferts d'énergie, la morphogénèse et la détermination sexuelle, la photosynthèse et la régulation des hormones de croissance des plantes [Di Carlo *et al.*, 1999 ; Pietta, 2000].

**Importance dans l'alimentation.** La contribution au régime alimentaire humain des flavonoïdes est très importante : de 50 à 800 mg/jour en fonction de la consommation de fruits et légumes mais aussi de boissons comme le thé ou le vin rouge (environ 200 mg par verre ou tasse) [Pietta, 2000]. On trouve également des flavonoïdes dans de nombreuses plantes médicinales et des préparations à base de plantes contenant de flavonoïdes sont utilisées en médecine traditionnelle partout dans le monde [Hollman et Arts, 2000].

**Propriétés chimiques et activités biologiques.** La propriété fondamentale des flavonoïdes est leur caractère antioxydant. A ce titre, ils agissent à plusieurs niveaux :

- **Inhibition d'enzymes ou chélation des éléments traces impliqués dans la formation de radicaux : suppression de la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) [Pietta, 2000].**

Les flavonoïdes inhibent la xanthine oxydase, source biologique importante du radical superoxyde ( $O_2 \bullet^-$ ). Ils sont également connus pour inhiber d'autres enzymes impliquées dans la

génération de ROS telles que les cyclooxygénases, les lipooxygénases, ou les monooxygénases microsomiales [Pietta, 2000].

Le radical superoxyde réagit avec le peroxyde d'hydrogène (en présence de fer) pour donner par dismutation, des radicaux hydroxyles encore plus toxiques (OH•). C'est cette réaction, appelée réaction de Fenton, catalysée par le fer, qui est inhibée par certains flavonoïdes (tels que la quercétine) par une action de chélation du fer [Cuyckens et Claeys, 2004].

#### ▪ Piégeage de radicaux

En raison de leur faible potentiel redox, les flavonoïdes peuvent réduire les radicaux libres très oxydés comme les superoxydes, les radicaux peroxydes ou les radicaux hydroxyles par transfert d'hydrogène [Pietta, 2000]. L'oxyde nitrique qui forme, en se combinant avec le radical superoxyde, le très délétère peroxynitrite est également piégé par les flavonoïdes. Le radical flavonoïde ainsi formé est stable et interrompt les événements de dégradation cellulaire initiés par l'attaque radicalaire [Hollman et Katan, 1997].

Les radicaux seraient responsables d'altérations des acides nucléiques et des processus d'altérations d'initiations et de cancérisation ainsi que de dégradations cellulaires liées à leur réactivité avec les phospholipides membranaires (phénomènes de peroxydation). Ces dommages oxydatifs peuvent être impliqués dans de nombreuses affections : cancers, inflammations chroniques, athéroscléroses...

Ainsi, leur propriété de piègeurs de radicaux implique les flavonoïdes dans la prévention des dommages oxydatifs causés par les ROS sur les molécules cellulaires. De nombreuses études *in vitro* ont montré des activités des flavonoïdes contre les processus inflammatoires et, de ce fait, contre les maladies inflammatoires chroniques et l'arthrose. En empêchant les ROS d'altérer l'ADN, les flavonoïdes limitent les mutations et les processus de carcinogénèses [Merken et Beecher, 2000]. De ce fait, ils sembleraient également intervenir dans la prévention de cancers, démences, athérosclérose, hypertension et maladies cardio-vasculaires.

Outre leur pouvoir antioxydant, certaines classes possèdent des potentialités oestrogéniques (isoflavones) et, plus généralement, les flavonoïdes sont utilisés pour toute une gamme d'activités pharmacologiques : pour préserver l'intégrité vasculaire, pour leurs propriétés immunomodulatrices, anti-hépatotoxiques, anti-ostéoporotiques, pour leur actions antimicrobiennes et contre les allergies [Sannomiya *et al.*, 2005 ; de Rijke *et al.*, 2006] ; les flavonoïdes sont aussi connus pour leur action sur le tractus gastro-intestinal en tant qu'agents antiulcéreux, antispasmodiques, anti-sécréteurs et anti-diarrhéiques [Di Carlo *et al.*, 1999].

Des articles de synthèse concernant leur mécanisme d'action (la relation structure-activité liée à la fonction antioxydante, notamment, a été établie [Pietta, 2000]) et leurs utilisations thérapeutiques potentielles ont été publiées ces dernières années [Di Carlo *et al.*, 1999 ; Hollman, 2001]. De

nombreuses preuves ont été apportées sur l'importance des effets *in vitro* des flavonoïdes sur différents modèles biologiques et, en particulier, enzymatiques [Hollman et Katan, 1997]. Cependant, le potentiel thérapeutique des flavonoïdes n'est pas encore établi à cause de la connaissance limitée de leur absorption chez l'homme [Hollman et Katan, 1997]. La biodisponibilité des flavonoïdes étant en général assez faible chez l'homme [Bruneton, 1999], il est nécessaire d'être prudent quant à l'extrapolation des données *in vitro*.

A l'heure actuelle, le lien entre consommation de flavonoïdes et prévention de cancer est encore faible. Aucune étude épidémiologique n'a encore apporté la preuve que ce sont les flavonoïdes contenus dans les fruits, les légumes et les boissons comme le thé ou le vin rouge qui sont responsables de l'effet protecteur de ces aliments. A l'inverse, plusieurs études ont démontré que la consommation d'aliments riches en flavonoïdes est inversement corrélée au risque de développer des maladies cardio-vasculaires [Pietta, 2000 ; Hollman, 2001].

En raison de leur abondance dans les plantes consommées par l'homme et de leurs bénéfices potentiels pour la santé humaine, les flavonoïdes sont l'objet d'une attention croissante. Que ce soit pour l'étude des relations structure-activité, le contrôle de la qualité alimentaire ou le suivi de l'absorption et de la métabolisation de ces composés phénoliques naturels, il est nécessaire de disposer d'une méthode rapide et fiable d'analyse et d'identification de ces molécules dans les plantes et les systèmes biologiques. Parmi les méthodes envisageables, nous avons choisi de présenter la spectrométrie de masse.

## 4.2. Analyse structurale des flavonoïdes par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une méthode physico-chimique appliquée à la détermination structurale des composés organiques. Elle permet d'accéder à la masse moléculaire d'une substance et apporte des informations structurales par le biais de l'étude des fragments moléculaires engendrés [de Hoffmann *et al.*, 1999].

Parmi les méthodes analytiques, la spectrométrie de masse (MS) occupe une place privilégiée grâce à ses caractéristiques : méthode hautement sensible (détection de composés à l'état de traces en quantité inférieure au milligramme), spécifique, applicable à des mélanges complexes, combinable à de nombreuses techniques chromatographiques et possédant une grande variété d'applications (analyses chimiques qualitatives et quantitatives, interaction entre molécules, biomédecine, entre autres) [Prasain *et al.*, 2004].

Comme nous l'avons évoqué dans le paragraphe 4.1, l'importance biologique des flavonoïdes justifie l'attention considérable qui leur est portée et ainsi, leur séparation, leur identification et leur quantification dans divers milieux représentent un véritable enjeu. L'application des avancées de la spectrométrie de masse de ces dix dernières années aux flavonoïdes a fait faire un gigantesque bond en avant à l'étude de ces composés [Stobiecki, 2000]. Nous allons ici faire rapidement un point des techniques utilisées avant de nous pencher sur les éléments d'identification que procure cette technique.

**Note.** Dans cette partie, nous nous intéresserons essentiellement aux flavonoïdes *O*-glycosylés de types flavone, flavonol ou flavanone, ces classes étant les plus fréquemment rencontrés et notamment dans le cadre de nos travaux personnels.

### 4.2.1. Les différentes techniques d'ionisation en spectrométrie de masse

L'impact électronique (EI) et l'ionisation chimique (CI) ont apporté par le passé de nombreuses informations structurales mais nécessitaient des isollements préalables des substances à étudier et souvent des dérivations post-isollement car les flavonoïdes sont généralement non-volatils [Ma *et al.*, 1997].

La désorption de champ (FD) a ensuite permis l'étude des flavonoïdes sans dérivation mais posait des problèmes relatifs à la préparation des échantillons qui restreignaient l'application. D'autres techniques telles que l'ionisation par bombardement d'atomes rapides (FAB) et l'ionisation chimique directe (DCI) ont également été appliquées aux flavonoïdes [Stobiecki, 2000].

Ces dernières années, l'analyse par spectrométrie de masse des flavonoïdes s'est accrue avec le développement de techniques d'ionisation dites « douces » : l'électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) qui ont en outre permis l'analyse de très faibles quantités

d'échantillons bruts. L'ESI et l'APCI sont des techniques qui génèrent principalement des ions moléculaires pour des métabolites relativement petits tels que les flavonoïdes [Wolfender *et al.*, 2000]. Pour de nombreux auteurs, ce sont les techniques les plus adéquates pour l'étude des flavonoïdes [de Rijke *et al.*, 2003 ; Prasain *et al.*, 2004].

#### 4.2.2. Le couplage chromatographie-spectrométrie de masse

Ce sont surtout les possibilités de couplage avec des techniques chromatographiques qui ont fait le succès de l'analyse par MS des flavonoïdes [Stobiecki, 2000]. La chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) est très peu utilisée pour l'analyse des flavonoïdes car les flavonoïdes glycosylés sont très peu volatils.

Avec le développement des sources d'ionisation à pression atmosphérique (APCI, ESI), le couplage de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse (LC-MS) est devenu la technique la plus efficace et de ce fait la plus utilisée pour l'analyse des flavonoïdes dans des mélanges complexes (facilité de mise en œuvre et disponibilité d'appareils de routine performants et abordables). Les techniques de couplage sont plébiscitées car ne nécessitant pas d'étapes de purification préalable des composés, elles représentent un gain de temps important surtout lorsque les quantités d'échantillons disponibles sont faibles [Cuyckens et Claeys, 2004]. Il existe de nombreux exemples de l'application de cette technique pour l'analyse de mélanges de produits naturels complexes et, en particulier, de mélanges de flavonoïdes [Exarchou *et al.*, 2005 ; Lee *et al.*, 2005 ; Sannomiya *et al.*, 2005 ; Shahat *et al.*, 2005 ; Colombo *et al.*, 2006]

Le couplage LC-MS fournit, en fonction du type de technique de masse employée, divers éléments relatifs à la masse moléculaire de chaque constituant d'un mélange mais également des informations découlant du comportement en LC (temps de rétention en fonction du type de colonne), de l'absorbance UV et permet des comparaisons avec des standards ou des données préalablement acquises. C'est la technique de choix pour caractériser rapidement sans séparation chimique les éléments d'un mélange de composés naturels pour savoir s'ils sont, ou non, déjà connus et s'ils méritent les ressources requises pour leur isolement et leur détermination structurale (étape connue sous le terme anglais de *dereplication*) [Constant *et al.*, 1997 ; Prasain *et al.*, 2004]. Les informations apportées par la fragmentation sont primordiales pour une identification partielle ou une « *dereplication* » d'un mélange complexe [Wolfender *et al.*, 2000 ; Cuyckens et Claeys, 2004]. Pour l'identification de composés inconnus, la LC-MS à détection UV permet une identification rapide de la classe de flavonoïdes et est appliquée préalablement à une grande variété de LC-MS/MS ou LC-MS<sup>n</sup>. Ces techniques sont aussi employées pour l'analyse quantitative [Careri *et al.*, 1999 ; Merken et Beecher, 2000].

#### 4.2.3. Eléments d'identification des flavonoïdes par spectrométrie de masse

L'interprétation de la fragmentation des flavonoïdes par spectrométrie de masse permet d'accéder à de nombreux éléments utiles pour leur détermination structurale, cela permet notamment d'établir la distribution des fragments générés entre les cycles A et B de la génine. L'étude minutieuse des schémas de fragmentation peut aussi aider à déterminer la nature, l'enchaînement et le site d'attache des oses portés par la génine.

**Nomenclature.** Dans ce chapitre, pour décrire les fragments de flavonoïdes obtenus par spectrométrie de masse, on utilisera le système de nomenclature proposé par Ma *et al.*, désormais communément utilisé [Ma *et al.*, 1997]. Pour les génines, les notations  $^{ij}A^{\pm}$  et  $^{ij}B^{\pm}$  sont utilisées pour désigner les ions primaires produits contenant les cycles, respectivement A et B, intacts (i et j désignant les liaisons qui ont été scindées). Dans le cas des flavonoïdes *O*-glycosylés, on utilisera la nomenclature de Domon et Costello reprise par Cuyckens et Claeys :  $Y_0$  désigne l'ion de la génine et  $Y_n$ , l'ion de la génine portant n monoglycosides (voir figure II 31). Dans certains cas, la position du clivage osidique sera indiquée par un chiffre en exposant, par exemple  $Y_7^{\pm}$  l'ion résultant du clivage d'un sucre fixé en position 7 sur la génine [Cuyckens et Claeys, 2004].

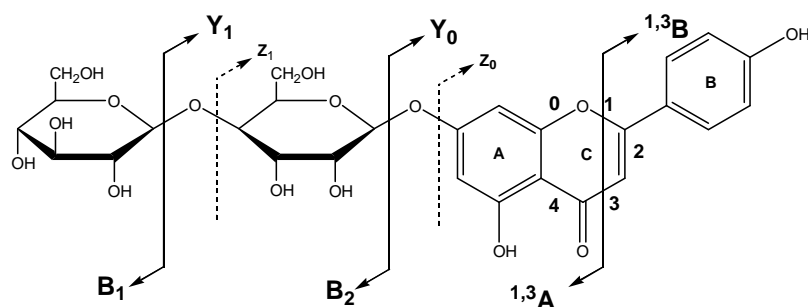


Figure II 31. Nomenclature simplifiée utilisée pour désigner les fragments flavonoïdes d'après Ma *et al.* et Domon et Costello [Ma *et al.*, 1997 ; Cuyckens et Claeys, 2004].

#### 4.2.3.1. Etude des génines de flavonoïdes par MS

Une approche détaillée de la caractérisation de la partie génine d'un flavonoïde consiste à faire subir une fragmentation MS/MS à l'ion moléculaire de la molécule<sup>3</sup> (fragmentation par dissociation induite par collision ou CID) puis de sélectionner l'ion  $Y_0$  ( $Y_0^+$  ou  $Y_0^-$ ) de la génine pour, à nouveau, lui faire subir une fragmentation par CID (MS/MS/MS ou  $MS^3$ ) [Wolfender *et al.*, 2000].

Cependant, il arrive fréquemment suivant le type de spectromètre utilisé, que la fragmentation dans la source produise l'ion de la génine ( $Y_0^+$  ou  $Y_0^-$ ) utilisable pour la CID. C'est cet ion qui subit alors la MS/MS produisant de ce fait une « pseudo  $MS^3$  ».

En spectrométrie de masse, pour l'identification de la génine, les fragments de  $Y_0$  les plus porteurs d'informations sont ceux résultant d'un clivage C-C sur le cycle C. La formation de ces ions peut

<sup>3</sup> Le pic de  $m/z$  le plus important n'est pas forcément l'ion moléculaire (respectivement  $[M+H]^+$  ou  $[M-H]^-$  en mode positif ou négatif), car des adduits ( $Na^+$ ,  $K^+$ ) (en mode positif) ou des complexes moléculaires ( $[2M+H]^+$  ou  $[2M-H]^-$ ) peuvent être générés.

s'expliquer par des réactions de type rétro Diels-Alder (RDA). Cela donne alors le nombre et le type de substituants portés par les cycles A et B [Cuyckens et Claeys, 2004].

**Fragmentation de la génine en mode positif.** En mode positif, les fragmentations les plus utiles en terme d'identification de la génine sont celles qui ont lieu entre les liaisons C-C 1 et 3, 0 et 2 ou 0 et 4 sur le cycle C (figures II 31 et II 32), aboutissant à la formation des ions informateurs/diagnostiques  $^{ij}A^+$  et  $^{ij}B^+$  [Ma *et al.*, 1997]. La fragmentation dépend de la classe de flavonoïdes étudiée et la valeur  $m/z$  des ions  $^{ij}A^+$  et  $^{ij}B^+$  indique clairement les substitutions respectives des cycles A et B [Wolfender *et al.*, 2000].

Ma *et al.* ont étudié les voies de fragmentation en mode positif des génines de flavones et flavonols (en ionisation FAB sur un spectromètre à triple quadripôle (TQ), énergie CID : 30 eV) et ont permis de mettre en évidence les fragments caractéristiques de ces deux classes de flavonoïdes en interprétant les valeurs  $m/z$  de ces fragments [Ma *et al.*, 1997] (figure II 32).

L'ion  $^{1,3}A^+$ , observé pour tous les groupes de flavonoïdes est le fragment le plus abondant. Dans le cas le plus fréquent où les positions 5 et 7 sont hydroxylées (mettre des exemples),  $^{1,3}A^+$  a une valeur de  $m/z$  153 ou, en absence de cétone en position 4, c'est-à-dire pour les flavanes ou les flavanols,  $m/z$  139. [Wolfender *et al.*, 2000].

Il existe des ions diagnostiques de certaines classes de flavonoïdes (figure II 32). Typiquement, la fragmentation caractéristique en mode positif d'une flavone est le résultat de trois voies de fragmentation qui coexistent, dont deux correspondant à des réactions de rétro Diels-Alder. Elles produisent les ions  $^{1,3}A^+$ ,  $^{1,3}B^+$ ,  $^{0,2}B^+$ ,  $^{0,4}B^+$  et ( $^{0,4}B^+ - H_2O$ ). Comparés aux flavones, les spectres CID des flavonols en mode positif sont beaucoup plus complexes car la présence d'un groupement OH en position 3 offre plus de possibilités de fragmentations [Ma *et al.*, 1997]. On observe alors les ions  $^{1,3}A^+$ ,  $^{0,2}A^+$ ,  $^{0,2}A^+ - CO$ ,  $^{1,4}A^+ + 2H$  et  $^{1,3}B^+ - 2H$  [Ma *et al.*, 1997 ; Wolfender *et al.*, 2000]. Tous ces ions caractéristiques, ainsi que ceux des flavanones, sont illustrés figure II 32.



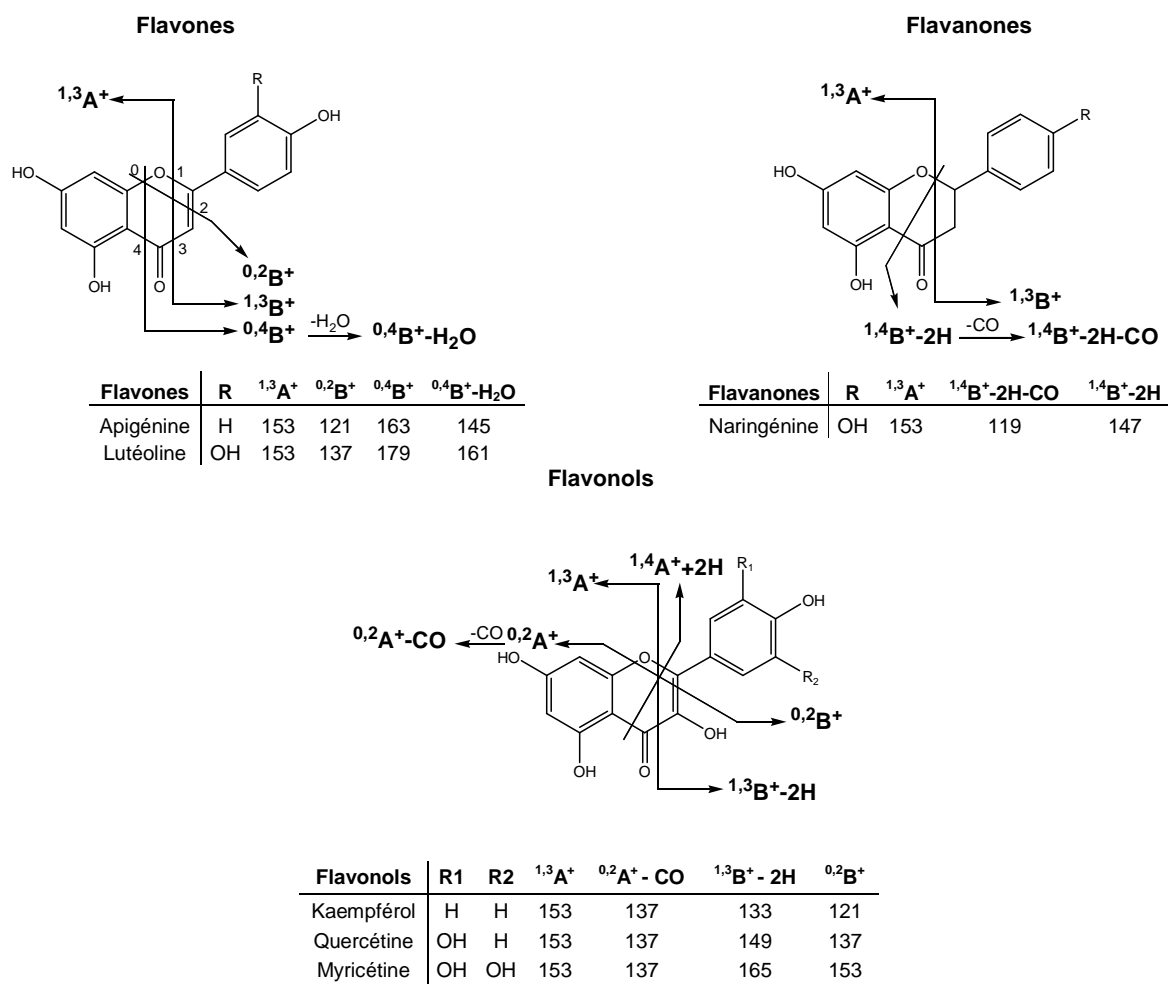


Figure II 32. Voies de fragmentations caractéristiques en mode positif des flavones, flavonols et flavanones (obtenues sur spectromètre Q-TOF avec source d'ionisation APCI ou trappe d'ion (IT) avec source ESI, énergie CID : 20-40 eV) d'après Wolfender *et al* [Wolfender *et al.*, 2000].

L'étude de ces ions fragments permet de faire la distinction entre deux génines isomères appartenant à des classes différentes. A titre d'exemple, la figure II 33 présente les spectres MS/MS de la lutéoline (génine flavone) et du kaempférol (génine flavonol) donnant tous les deux un ion *quasi*-moléculaire à  $m/z$  287.

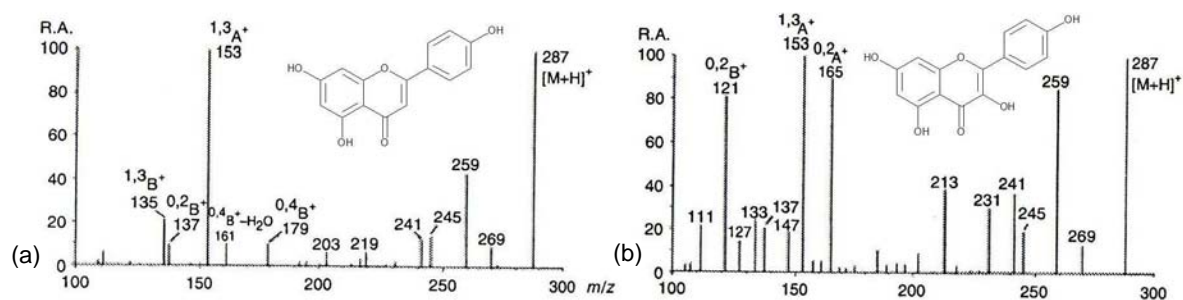


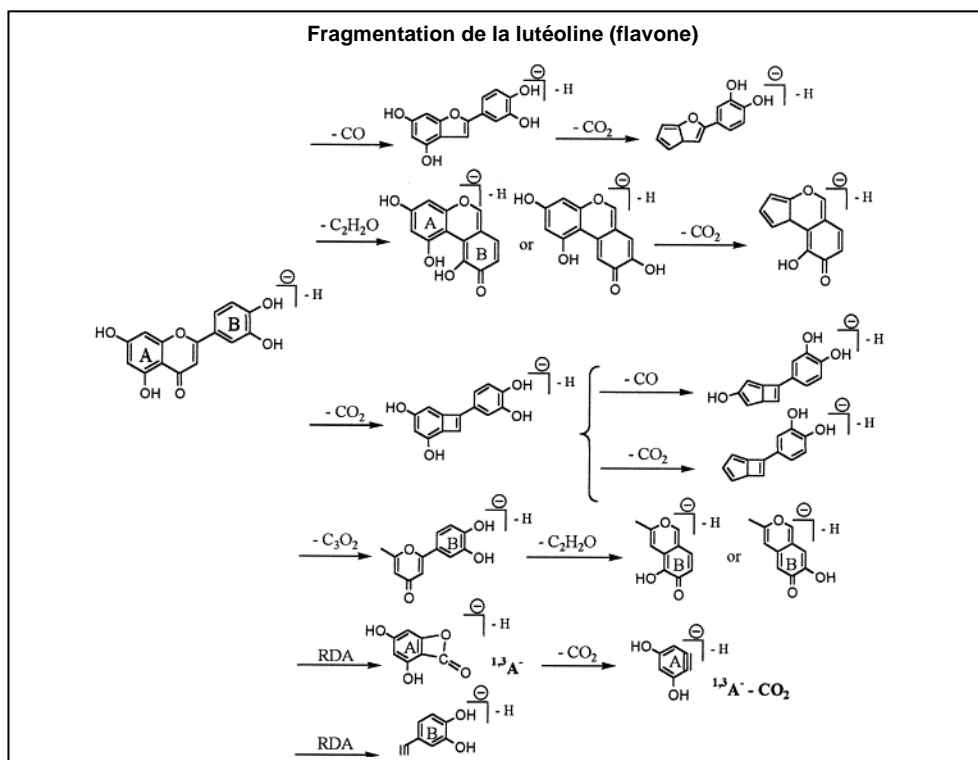
Figure II 33. Spectre MS/MS de la lutéoline (a) et du kaempférol (b) obtenus par ESI en mode positif (analyseur TQ équipé d'une source d'ionisation FAB, CID de basse énergie).

Comme en mode positif, les fragmentations qui ont lieu sur le cycle C et les réactions de RDA produisant les ions  ${}^{\text{ij}}\mathbf{A}^-$  et  ${}^{\text{ij}}\mathbf{B}^-$  donnent des informations sur le nombre et le type de substituants des cycles A et B.

**Fragmentation de la quercétine (flavonol)**

The diagram illustrates the fragmentation pathways of the quercetin radical anion. The starting material is the quercetin radical anion, shown with its characteristic A and B rings. The fragmentation proceeds through several steps:

- Top Pathway:** The quercetin radical anion loses CO to form a radical intermediate, which then loses CO<sub>2</sub> to form a diradical intermediate. This intermediate further loses CO and CO<sub>2</sub> to form a 1,2A<sup>-</sup> radical.
- Bottom Pathway:** The quercetin radical anion loses CO<sub>2</sub> to form a radical intermediate. This intermediate undergoes retrocyclization to form a 1,2A<sup>-</sup> radical. The 1,2A<sup>-</sup> radical then loses CO and CO<sub>2</sub> to form a 1,2A<sup>-</sup> CO CO<sub>2</sub> radical.
- Other Pathways:** The quercetin radical anion can also lose CO<sub>2</sub> to form a radical intermediate, which then undergoes retrocyclization to form a 1,2B<sup>-</sup> radical.



**Figure II 34.** Fragmentations proposées par Fabre *et al.* pour l'anion *quasi*-moléculaire flavone (ici lutéoline) et l'anion *quasi*-moléculaire flavonol (ici quercétine) illustrant les voies de fragmentations caractéristiques et les rétro Diels-Alder (RDA) (source ESI, analyseur à trappe d'ions (IT), basse énergie de dissociation) [Fabre *et al.*, 2001].

Cette étude a permis de dégager des caractéristiques générales ; en mode négatif, le fragment principal est l'ion  $^{1,3}\text{A}^-$  sauf pour les isoflavones où l'ion majoritaire et caractéristique est l'ion  $^{0,3}\text{B}^-$  [Hughes *et al.*, 2001]. Il a été démontré par Fabre *et al.* que les flavones montrent des pertes de neutres caractéristiques CO (-28 u) et CO<sub>2</sub> (-44 u) qui sont dues à une contraction caractéristique du cycle C. La perte d'H<sub>2</sub>O, [M-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, indique la présence de 2 groupements OH, en ortho l'un de l'autre, sur l'un des cycle A ou B [Wu *et al.*, 2004].

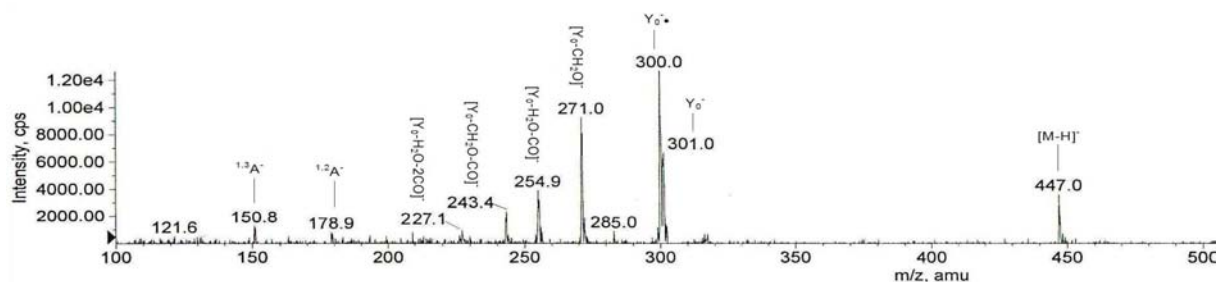
Le degré d'hydroxylation du cycle B a un impact sur la fragmentation. Par exemple, pour des flavonols contenant au moins deux groupements OH sur le cycle B, (quercétine, myricétine, fisétine...), les ions [ $^{1,2}\text{A-H}$ ]<sup>-</sup> et [ $^{1,2}\text{B+H}$ ]<sup>-</sup> sont observables alors que dans les cas d'un cycle B non substitué, l'énergie requise pour aboutir à une fragmentation est beaucoup plus importante et de trop nombreux ions se forment alors [Cuyckens *et al.*, 2000 ; Fabre *et al.*, 2001].

Le tableau II 6 recense les fragments observés en mode négatif pour quelques composés de type flavones, flavonols et flavanones.

**Tableau II 6. Exemples d'ions fragments observés pour des flavones, flavonols et flavanones d'après de Rijke *et al*, CID : 25-30 eV. [de Rijke *et al.*, 2006].**

Composés	Substituants		Ions fragments										
	- OH	- OCH <sub>3</sub>	[M - H] <sup>-</sup>	<sup>0,3</sup> A <sup>-</sup>	<sup>0,3</sup> B <sup>-</sup>	<sup>0,4</sup> A <sup>-</sup>	<sup>1,2</sup> A <sup>-</sup>	<sup>1,2</sup> B <sup>-</sup>	<sup>1,3</sup> A <sup>-</sup>	<sup>1,3</sup> B <sup>-</sup>	<sup>1,4</sup> A <sup>-</sup>	<sup>1,4</sup> B <sup>-</sup>	[M - H - 15] <sup>•</sup>
<b>Flavones</b>													
flavone			221	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7-hydroxyflavone	7		237	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4'-hydroxyflavone	4'		237	—	—	—	—	—	—	117	—	—	—
6,4'-dihydroxy-flavone	6,4'		253	—	134	—	—	—	—	117	—	—	—
genkwanine	4'	7	283	—	—	—	—	—	151	—	—	—	268
apigénine	5,7,4'		269	—	—	107	—	—	151	117	—	149	—
chrysine	5,7		253	—	—	—	—	—	151	101	—	—	—
acacétine	5,7	4'	283	—	—	107	—	—	151	133	—	—	268
lutéoline	5,7,3',4'		285	—	—	107	—	—	151	133	—	—	—
<b>Flavonols</b>													
galangine	5,7		269	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
kaempférol	5,7,4'			135		107	—	—	151	—	—	161	—
kampféride	5,7	4'	299	—	—	—	—	—	151	132	—	—	284
quercétine	5,7,3',4'		301	—	—	107	179	121	151	—	—	—	—
morine	5,7,2',4'		301	—	—	107	—	—	151	—	—	—	—
rhamnétine	5,3',4',	7	315	—	—	121	—	—	165	—	—	—	300
isorhamnétine	5,7,4',	3'	315			107	—	—	151	—	—	—	300
fisétine	7,3',4'		285	—	—	—	163	121	—	—	—	—	—
<b>Flavanones</b>													
naringénine	5, 7, 4'		271	—	—	107	—	—	151	119	—	—	—
hespérétine	5,7,3',	4'	301	—	—	107	—	—	151	—	—	—	286
ériodictyol	5,7,3',4'		287	—	—	107	—	—	151	135	125	—	—
isosakuramétine	5,7	4'	285	—	—	—	—	—	151	—	125	—	270

En mode négatif, il arrive que le spectre du premier ordre produise toutes les informations nécessaires sans avoir à procéder à de la MS/MS (figure II 35) car la tension de la source induit déjà une fragmentation de la génine [Cuyckens et Claeys, 2004].

**Figure II 35. Fragmentation de la génine sur le spectre de premier ordre d'un flavonol (quercétine-3-O-rhamnoside) mesuré en ESI en mode négatif (basse énergie de fragmentation).**

**Flavonoïdes méthoxylés et autres substituants.** Dans les deux modes (positif et négatif), en plus de l'apparition d'ions dus à la fragmentation caractéristique des classes de génines, la perte de petites molécules neutres comme CO (-28 u), CO<sub>2</sub> (-44 u) ou C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O (-42 u) et la perte successive de ces fragments, par exemple -H<sub>2</sub>O-CO (-46 u) est communément observée. Ces pertes de neutres et/ou de radicaux sont utiles pour identifier la présence de groupes fonctionnels spécifiques [Cuyckens et Claeys, 2004].

La fragmentation d'un flavonoïde méthoxylé par exemple, entraîne la formation d'un ion radicalaire caractéristique  $[M+H-CH_3]^{\pm\bullet}$  (perte de 15 unités) qui constitue le pic de base [Hvattum et Ekeberg, 2003]. Justesen *et al.* ont montré que dans le cas des flavonoïdes monométhoxylés, les fragments  $[M+H-28]^{\pm\bullet}$  et  $[M+H-29]^{\pm\bullet}$  sont également caractéristiques alors que  $[M+H-CH_3]^{\pm\bullet}$ ,  $[M+H-30]^{\pm\bullet}$  et  $[M+H-28-30]^{\pm\bullet}$  sont prédominants dans le cas de flavonoïdes polyméthoxylés [Justesen, 2001].

Ils ont également mis en évidence qu'il est possible, en mode négatif, en comparant la fragmentation des flavonoïdes méthoxylés avec celle de témoins méthoxylés de même masse, de déduire la position du groupement méthyle.

#### 4.2.3.2. Apports de la MS à l'étude des flavonoïdes O-glycosylés

Les méthodes de spectrométrie de masse permettent, dans de nombreux cas, en plus de l'identification de la génine, de déduire la position de la ou des glycosylations, le type de liaison interglycosidique et/ou la nature du sucre terminal.

**Clivage hétérolytique : formation des ions  $Y_n$ .** La fragmentation par spectrométrie de masse des flavonoïdes O-glycosylés produit un clivage de la liaison osidique avec réarrangement de protons (voir figure II 37). Il y a alors production de l'ion fragment  $Y_0^+$  ou  $Y_0^-$  (fragment correspondant à la génine) et élimination d'un résidu monosaccharidique qui s'illustre par la perte de 162 u pour un hexose, 146 u pour un rhamnose, 132 u pour un pentose et 176 u pour un acide glucuronique permettant ainsi de déterminer la nature des sucres. [Wolfender *et al.*, 1992 ; Cuyckens et Claeys, 2004].

**Clivage homolytique : formation du radical  $Y_0^\bullet$ .** En fonction de sa structure, un flavonoïde O-glycosylé peut subir, en plus du clivage hétérolytique donnant l'ion  $Y_0$ , un clivage homolytique de la liaison osidique produisant l'ion radical de la génine noté  $Y_0^\bullet$ . La figure II 36 illustre l'effet de l'énergie de collision (CE) sur l'abondance relative de  $Y_0^\bullet$ .

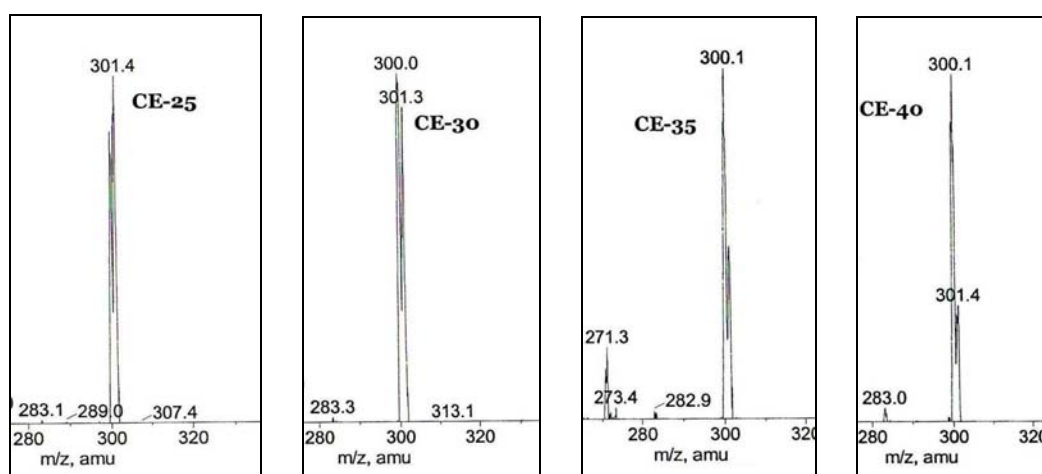


Figure II 36. Influence de l'énergie de collision (CE) sur l'intensité du radical  $Y_0^\bullet$  en ESI en mode négatif, illustré sur un flavonol glycosylé à génine quercétine ( $Y_0^\bullet$   $m/z$  300 et  $Y_0^-$   $m/z$  301) (analyseur triple quadripôle).

La production par CID en mode positif de cet ion radicalaire a été étudiée par Hvattum et Ekeberg. Les auteurs ont démontré que l'étude de l'abondance relative de ce radical par rapport à l'ion de la génine apportait des informations sur celle-ci. Pour les flavonols 3-*O*-glycosylés, le rapport  $Y_0^\bullet/Y_0^+$  augmente avec le nombre de groupements hydroxyles portés par le cycle B alors que c'est l'inverse qui se produit pour les flavones 7-*O*-glycosylées [Hvattum et Ekeberg, 2003]. Ce radical n'est en outre pas observé dans le cas de flavonoïdes méthoxylés ni pour les flavanones ou les dihydrochalcones indiquant qu'une double liaison entre les positions 2 et 3 de la génine adjacente au carbonyl C-4 est requise pour la formation d'un radical génine stable [Cuyckens et Claeys, 2004].

Il est à noter que Hvattum et Ekeberg voient un lien entre la capacité d'un flavonol *O*-glycoside à produire en MS un ion radicalaire et l'activité antioxydante de ce composé. La capacité des flavonols *O*-glycosylés à fournir un radical génine serait similaire à la capacité antioxydante des flavonoïdes (donneur d'électron). La fragmentation d'un flavonoïde glycosylé  $[M-H]^-$  génère un radical anion alors que l'activité antioxydante génère un produit radicalaire neutre [Hvattum et Ekeberg, 2003 ; Hvattum *et al.*, 2004].

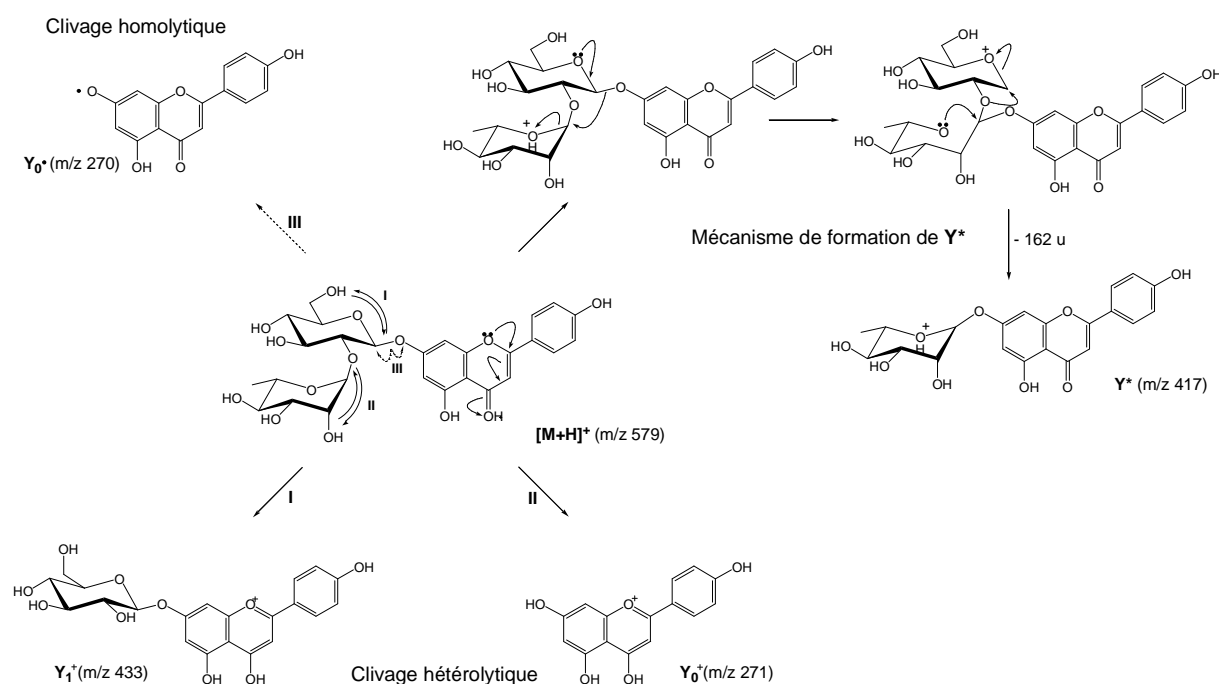


Figure II 37. Synthèse des mécanismes de formation des ions  $Y_0^+$ ,  $Y_1^+$ ,  $Y_0^\bullet$  et  $Y^*$  lors de la fragmentation d'un flavonoïde, illustré ici en mode positif sur l'apigénine-7-*O*-néohespéridoside (source ESI, analyseur TQ, basse énergie de fragmentation).

**Position de la liaison osidique sur la génine.** Plusieurs sites de glycosylation sont possibles pour les flavonoïdes *O*-glycosylés rendant la détermination de cette localisation délicate. La majorité des substituants osidiques se situent au niveau des positions 3, 7 ou 4'. La substitution du groupement

5 est très rare dans la mesure où ce groupe présente une faible réactivité pour la glycosylation car il participe à la formation d'une liaison H intramoléculaire avec le groupement carbonyle 4.

En mode négatif, la position de la glycosylation peut être déduite de l'abondance relative du radical génine  $Y_0^\bullet$  par rapport à  $Y_0^-$  sur le spectre de dissociation de la génine. Ce radical est très abondant quand la liaison osidique se situe en position 3 [Hvattum et Ekeberg, 2003]. Cependant, les travaux de Cuyckens et Claeys ont montré que le ratio  $Y_0^\bullet/Y_0^-$  ne peut que suggérer une certaine position pour le sucre ou aider en cas de comparaison avec des témoins [Cuyckens et Claeys, 2005].

La fragmentation du radical peut aussi apporter des informations, puisque en fonction du site de glycosylation, le radical est localisé à des endroits différents de la molécule. La fragmentation du radical génine requiert une forte énergie de dissociation. Cette fragmentation présente des différences avec la fragmentation de l'ion génine : les ions  $^{m,n}B^-$  produits sont plus abondants dans le cas d'une 7 *O*-glycosylation alors que pour les 4' *O*-glycosylations, les ions  $^{m,n}A^-$  sont relativement plus abondants [Cuyckens et Claeys, 2005].

Ces deux techniques (ratio  $Y_0^\bullet/Y_0^-$  et fragmentation de  $Y_0^\bullet$ ) ne peuvent être appliquées qu'en comparaison avec des témoins connus. Elles sont insuffisantes dans le cas d'un spectre flavonoïde *O*-glycosylé inconnu seul [Cuyckens et Claeys, 2005].

En mode positif, Cuyckens et Claeys se sont penchés sur la fragmentation en haute énergie de l'ion adduit  $[M+Na]^+$ . Les adduits sodium peuvent être très communs et très abondants quand la solution étudiée a été stockée dans des récipients en verre mais leur présence dépend également de la source d'ionisation employée et de la géométrie de cette source. En fait, la fragmentation de cet ion adduit permet de localiser de façon certaine la position du groupement osidique. En effet, la présence d'un ion du cycle B contenant le résidu osidique indique une liaison osidique en position 4' alors que la perte du cycle B de la génine est caractéristique d'une liaison en position 3 ; la perte du cycle B à la fois sur l'ion précurseur  $[M+Na]^+$  et sur l'ion de la génine est le signe d'une liaison en position 7 [Cuyckens et Claeys, 2005].

**Flavonoïdes di-*O*-glycosylés et *O*-diglycosylés.** Plusieurs équipes et en particulier celle de Claeys ont étudié l'application des méthodes de spectrométrie de masse, notamment MS/MS à l'étude de la différenciation des isomères de flavonoïdes. Ils ont mis en évidence que cette différenciation était rendue possible par l'abondance relative de trois ions caractéristiques que nous illustrerons dans le cas d'une substitution par un rutinose ou un néohespéridose (les disaccharides les plus fréquents) :  $Y_1$ , dans notre exemple  $[M+H-Rha]^+$ ,  $Y_0$ , l'ion de la génine  $[M+H-Rha-Glu]^+$  et un ion inattendu appelé  $Y^*$  formé par la perte d'un glucose interne. La formation des trois ions est illustrée à la figure II 37.

La présence de l'ion  $Y^*$  peut induire en erreur quant à la séquence des sucres. En effet, cet ion a 162 unités de masse de différence par rapport à  $[M+H]^+$ , ce qui pourrait correspondre à la perte d'un

glucose terminal. De ce fait,  $Y^*$  pourrait être l'ion  $Y_1$  d'un isomère dont la séquence serait Glu-Rha au lieu de Rha-Glu [Ma *et al.*, 2001].

L'abondance de l'ion  $Y^*$  est dépendante de l'énergie de collision (favorisée par les faibles énergies), la nature de la génine et du type de liaison interglycosidique.

Ma *et al.* ont montré que, en ionisation par FAB en mode positif, pour les flavonoïdes 7-*O*-diglucosylés, la perte de glucose interne (présence de l'ion  $Y^*$ ) est très prononcée pour les génines de type flavanone alors qu'il est complètement absent pour les flavones et flavonols. [Ma *et al.*, 2000 ; Cuyckens *et al.*, 2001].

La liaison interglycosidique peut être déterminée par la valeur du ratio  $Y_0/Y_1$  : le ratio était plus grand quand le substituant est un néohespéridose (rhamnosyl-( $\alpha 1 \rightarrow 2$ )-glucoside) que quand il s'agit d'un rutinose (rhamnosyl-( $\alpha 1 \rightarrow 6$ )-glucoside) [Ma *et al.*, 2001]. D'autres études sur les substitutions par néohespéridose et rutinose sur un appareillage différent ont abouti aux mêmes conclusions. [Cuyckens *et al.*, 2001].

Les flavonoïdes 3,7-di-*O*-glycosides portant deux monosaccharides de masse différents peuvent être différenciés. Pour les molécules protonées (mode positif), le résidu 3-*O*-glycoside est plus facilement perdu que le résidu 7-*O*-glycoside ( $Y_0^{7+} < Y_0^{3+}$ ) alors que c'est l'inverse qui est observé pour les molécules déprotonées ( $Y_0^{7-} > Y_0^{3-}$ ) (mode négatif) ou les molécules sodées (mode positif) [Shahat *et al.*, 2005]. Ablajan *et al.* ont démontré que pour caractériser un flavonoïde de type flavonol 3,7-di-*O*-glycoside en mode négatif, les deux ions  $[Y_0^3-H]^-$  et  $[Y_0-2H]^-$  doivent être présents dans le spectre MS/MS de  $[M-H]^-$  ( $[Y_0-2H]^-$  n'est jamais observé dans le cas d'un flavonoïde *O*-diglycosylé). De plus, l'abondance de ces deux ions est proportionnelle au nombre de groupements hydroxyles portés par le cycle B [Ablajan *et al.*, 2006].

Certaines équipes, notamment celle de Brodbelt, ont développé d'autres méthodes pour différencier les isomères de flavonoïdes di-*O*-glycosylés et *O*-diglycosylés. Ces méthodes sont généralement plus difficiles à mettre en œuvre et ne sont pas utilisées en routine.

Une de ces méthodes consiste en l'addition d'un sel de métal ( $Cu^{2+}$  ou  $Co^{2+}$ ) et d'un ligand (par exemple le 2,2'-bipyridine) pour former des complexes  $[M(II) (flavonoïde-H) Ligand]^+$ . Les schémas de fragmentation de ces complexes permettent de distinguer facilement les liaisons ( $1 \rightarrow 2$ ) ou ( $1 \rightarrow 6$ ) des sucres ou de distinguer les 7-*O*-diglucosylés des autres substitutions [Satterfield et Brodbelt, 2001]. Ces complexations peuvent être générées au moyen de dérivations post-colonnes et sont compatibles avec l'utilisation de la LC-MS [Davis et Brodbelt, 2005].



**Flavonoïdes di-, tri-, tetra-glucosylés.** En 2004, Ferreres *et al.* ont montré qu'il était possible en ESI de différencier les isomères de flavonoïdes portant deux glucoses (sophoroside : Glu-(1→2)-Glu ou gentiobioside : Glu-(1→6)-Glu, trois glucoses (sophorotrioside : Glu-(1→2)-Glu-(1→2)-Glu ou X-sophoroside-Y-glucoside) et même quatre glucoses (X-sophorotrioside-Y-glucoside ou X-sophoroside-Y-sophoroside) en se basant sur les abondances relatives des ions  $Y_n$  et  $Z_n$  [Ferreres *et al.*, 2004].

**Identification du sucre terminal.** Comme nous l'avons vu précédemment, la succession de clivages hétérolytiques aboutissant à la formation des ions  $Y_n$  permet d'identifier la séquence des sucres portés par une génine. Il est théoriquement possible d'identifier le sucre terminal d'un flavonoïde glycosylé en spectrométrie de masse. Cependant, le fragment saccharidique est rarement visible sur le spectre CID d'un flavonoïde car la charge reste généralement associée à la génine. En acétylant la molécule de flavonoïde *O*-glycoside, l'ion fragment du sucre peracétylé devient facilement détectable comme l'ont montré Cuyckens *et al.* Dans leur étude, ils ont démontré que dans le cas d'un flavonoïde acétylé, il est possible d'obtenir, dans des conditions particulières d'énergie de collision, une fragmentation stéréosélective et ainsi de pouvoir différencier certains isomères de monosaccharides (par exemple distinguer le glucose, du galactose ou du mannose) [Cuyckens *et al.*, 2002].

#### 4.2.4. Conclusion

Tout au long de ce chapitre, nous avons tenté de montrer que la spectrométrie de masse peut apporter une grande contribution à l'identification structurale des flavonoïdes. Cette puissante technique d'analyse, hautement sensible et permettant des déterminations structurales sans isolement des composés, est un formidable atout pour détecter la présence de métabolites secondaires dans des extraits végétaux (« *dereplication* »).

Aujourd'hui, de nouveaux développements augmentent son champ d'application (détection et quantification de substances dans les liquides biologiques, étude des interactions entre les molécules, études des métabolisations... [Franski *et al.*, 2003 ; Davis *et al.*, 2006]).

Malgré les avancées de la spectrométrie de masse au cours des dernières années, cette technique n'est pas suffisante pour l'identification de nouvelles structures flavonoïdiques mais est un préalable indispensable aux techniques de RMN mono et bi-dimensionnelles.

## **III. RESULTATS**

## 1. Screening chimique général préliminaire par CCM

Pour chacune des plantes de cette étude, *TTI* (*Tambourissa trichophylla*), *ASA* (*Agauria salicifolia*), *APY* (*Agauria polyphylla*), et *ECC* (*Embelia concinna*), nous disposons de quatre extraits nommés **F<sub>1</sub>** à **F<sub>4</sub>**. **F<sub>1</sub>** est l'extrait éthanolique 70 % de la plante et les trois autres fractions sont des extraits liquide/liquide successifs de la fraction aqueuse de **F<sub>1</sub>** par, respectivement, de l'hexane (**F<sub>2</sub>**) et de l'acétate d'éthyle (**F<sub>3</sub>**), (**F<sub>4</sub>**) étant la fraction aqueuse épuisée (cf. chapitre V).

Des chromatographies sur couche mince (CCM) préliminaires ont été menées sur les fractions **F<sub>1</sub>** à **F<sub>4</sub>** des quatre plantes pour avoir un aperçu de la nature des constituants que l'on peut rencontrer chez ces espèces. Pour cela, une partie des extraits **F<sub>n</sub>** ont été solubilisés dans le solvant approprié et déposés sur plaques de CCM qui ont ensuite été éluées dans les systèmes de solvants décrits au chapitre V et révélés avec divers réactifs pour permettre une première orientation sur les classes de composés présentes dans les échantillons à analyser (figure III 1A, 1B, et 1C). Les informations recueillies ont ensuite été confrontées aux données bibliographiques collectées sur les familles et les genres de ces plantes (cf. chapitre II).

### 1.1. Interprétation des CCM préliminaires de *Agauria salicifolia* (ASA) et *Agauria polyphylla* (APY)

Le criblage chimique en CCM a permis de mettre en évidence la présence de flavonoïdes (réactif de Neu, fluorescence jaune-orange sous lumière UV) dans les fractions polaires de ASA et APY.

On peut aussi émettre l'hypothèse que les composés polaires, qui apparaissent en rouge révélés à la vanilline sulfurique, sont des tanins (composés fréquents dans les *Ericaceae*). Pour valider cette hypothèse, nous avons utilisé un révélateur propre aux tanins. La coloration en rouge orange obtenue avec le réactif au sel de Bleu solide B de ces composés confirme que ce sont des tanins.

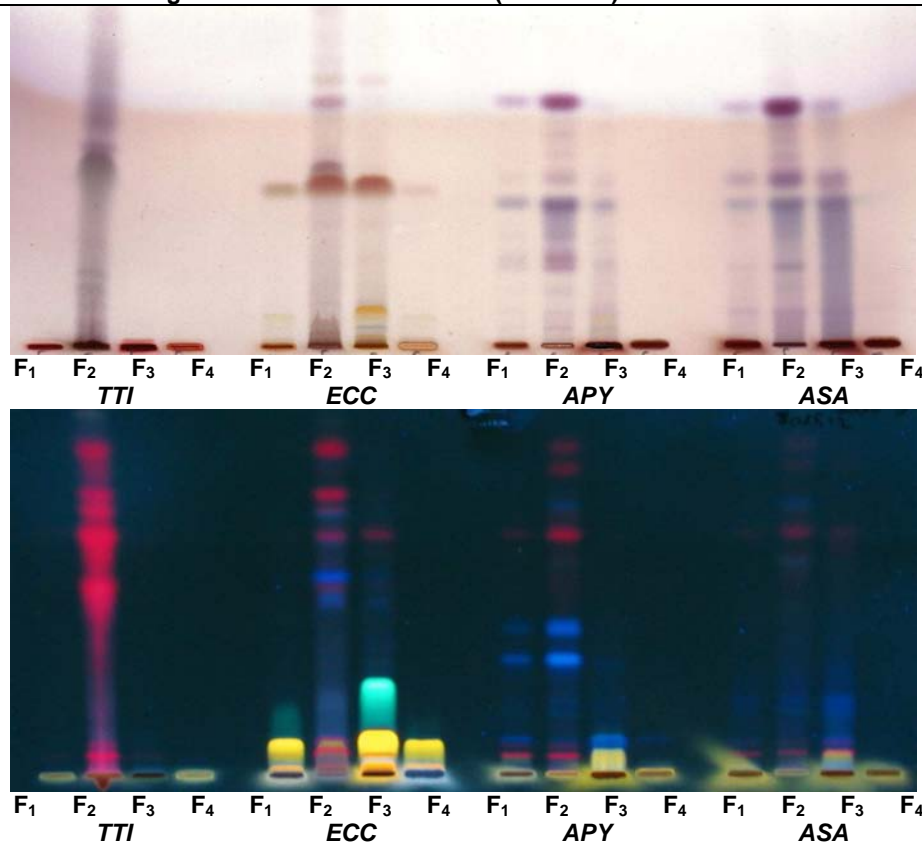
Les fractions apolaires semblent contenir des triterpènes (coloration bleue violette par révélation à la vanilline sulfurique (figure III 1A) et fluorescence à 366 nm par révélation avec le réactif de Liebermann et Burchard) et semblent identiques pour les deux espèces.

Les deux espèces semblent avoir des composés en commun et des profils similaires pour certains extraits mais diffèrent par la concentration notamment en tanins et flavonoïdes. On note cependant une différence majeure : une molécule polaire majoritaire de ASA **F<sub>1</sub>** et ASA **F<sub>3</sub>** (probablement de structure flavonoïdique) ne semble pas être présente dans les extraits de APY.

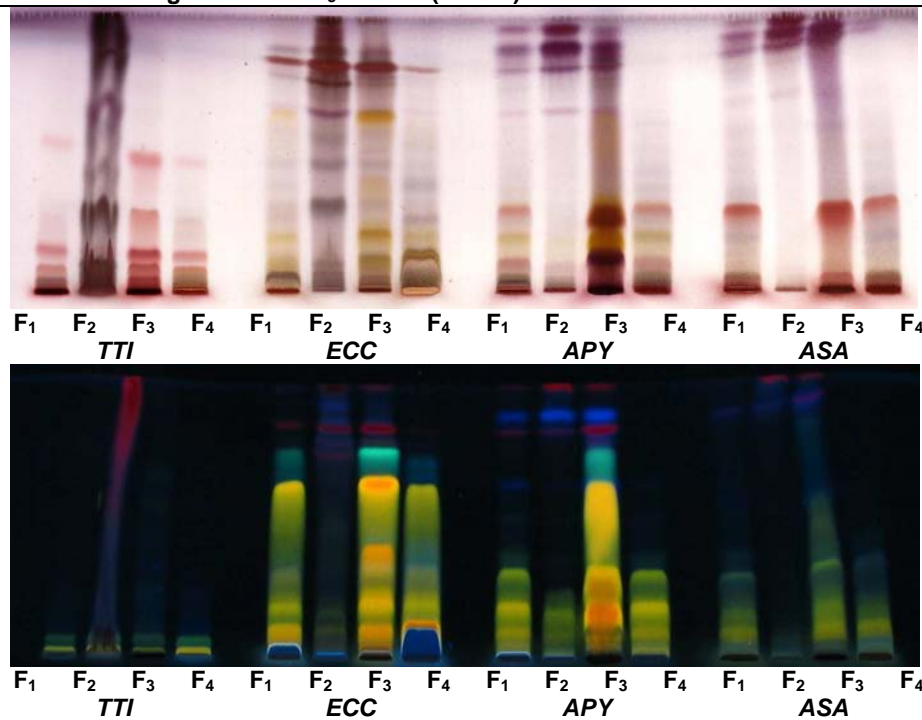
L'objectif de ce travail sera d'isoler les composés majoritaires de APY et certaines molécules de ASA afin de dégager des profils spécifiques pour chaque plante et de pouvoir les distinguer.

Solvant de migration : Tol / AcOEt / MeOH (80 : 18 : 2)

Révélation

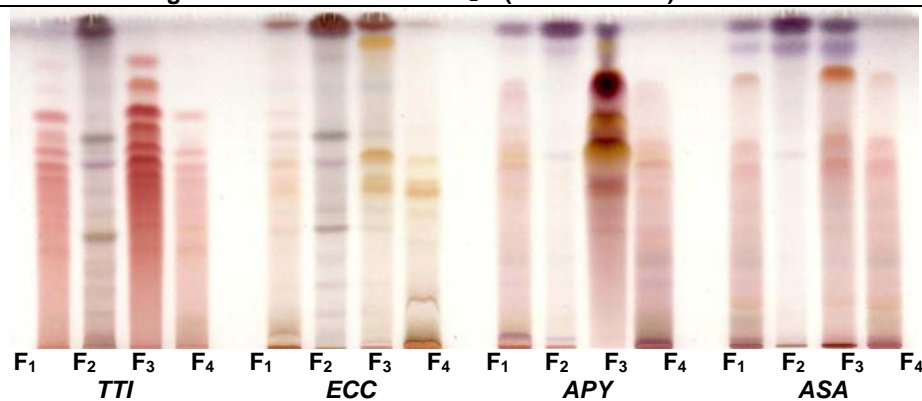
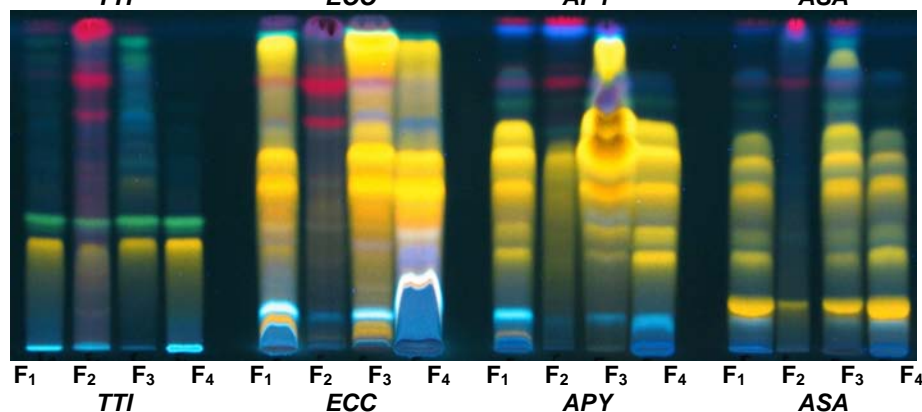
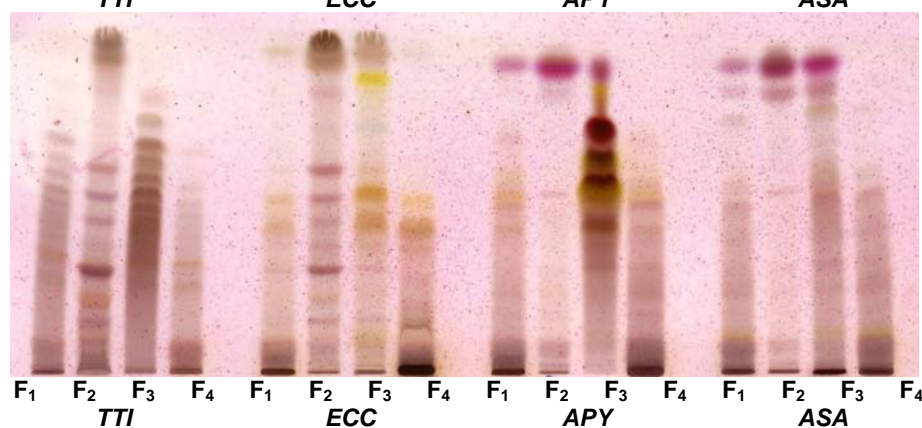
Figure III 1A. CCM préliminaires des fractions  $F_n$ , développement Tol / AcOEt / MeOH (80 : 18 : 2).Solvant de migration :  $\text{HCCl}_3$  / MeOH (90 : 10)

Révélation

Figure III 1B. CCM préliminaires des fractions  $F_n$ , développement  $\text{HCCl}_3$  / MeOH (90 : 10).

Solvant de migration : AcOEt / MeOH / H<sub>2</sub>O (100 : 13.5 : 10)

Révélation

Réactif à la vanilline  
sulfuriqueRéactif de Neu  
(observation 366 nm)Réactif au thymol  
sulfurique

Réactif de Dragendorff

Figure III 1C. CCM préliminaires des fractions F<sub>n</sub>, développement AcOEt / MeOH / H<sub>2</sub>O (100 : 13.5 : 10).

## 1.2. Interprétation des CCM préliminaires de *Tambourissa trichophylla* (*TTI*)

L'étude des différentes CCM de *TTI* nous a montré que, à l'instar des extraits de *ASA* et *APY*, *TTI* semble contenir des tanins (révélés en rouge à la vanilline sulfurique) (figure III 1B). Cela a été confirmé par la révélation au réactif au sel de Bleu solide B.

Les extraits polaires de *TTI* (**F<sub>1</sub>** et **F<sub>3</sub>**) semblent également contenir quelques flavonoïdes assez polaires. Deux d'entre eux semblent majoritaires et nous avons choisi de tenter de les isoler.

En outre, bien que *Tambourissa trichophylla* appartienne aux *Monimiaceae*, famille riche en espèces à alcaloïdes, les extraits de *TTI* ne semblent pas contenir d'alcaloïdes puisqu'on n'observe pas de réaction sur CCM avec le réactif de Dragendorff (réactif d'alcaloïdes).

## 1.3. Interprétation des CCM préliminaires de *Embelia concinna* (*ECC*).

L'étude par CCM des fractions **F<sub>n</sub>** de *ECC* (figure III 1B) montre la présence marquée de flavonoïdes dans les fractions **F<sub>1</sub>** et **F<sub>3</sub>** (fluorescence en vert ou jaune-orangé avec le réactif de Neu observée sous lumière UV).

Les composés apolaires des fractions **F<sub>1</sub>** à **F<sub>3</sub>** présentent des colorations violettes après révélation à la vanilline sulfurique à l'exception d'un composé majoritaire qui présente une teinte rougeâtre.

Nous allons tenter d'identifier ce composé apolaire ainsi que de caractériser la composition flavonoïdique de *ECC* afin d'établir un profil chimique spécifique.

## 2. Etude phytochimique des feuilles de *Agauria polyphylla* (APY) et de *Agauria salicifolia* (ASA)

### 2.1. *Agauria polyphylla* (APY)

L'espèce *Agauria polyphylla* Baker (*Ericaceae*) a retenu l'attention de Serdex en premier lieu pour ses utilisations traditionnelles à Madagascar dans le traitement des rhumatismes et pour soigner les plaies et, en second lieu, en raison du peu de travaux phytochimiques répertoriés sur elle. Lors du criblage d'activités pharmacologiques mené par Serdex, l'extrait **F<sub>3</sub>**, s'étant avéré être le plus actif, a été sélectionné pour être soumis à une investigation phytochimique approfondie.

#### 2.1.1. Travaux préliminaires au fractionnement

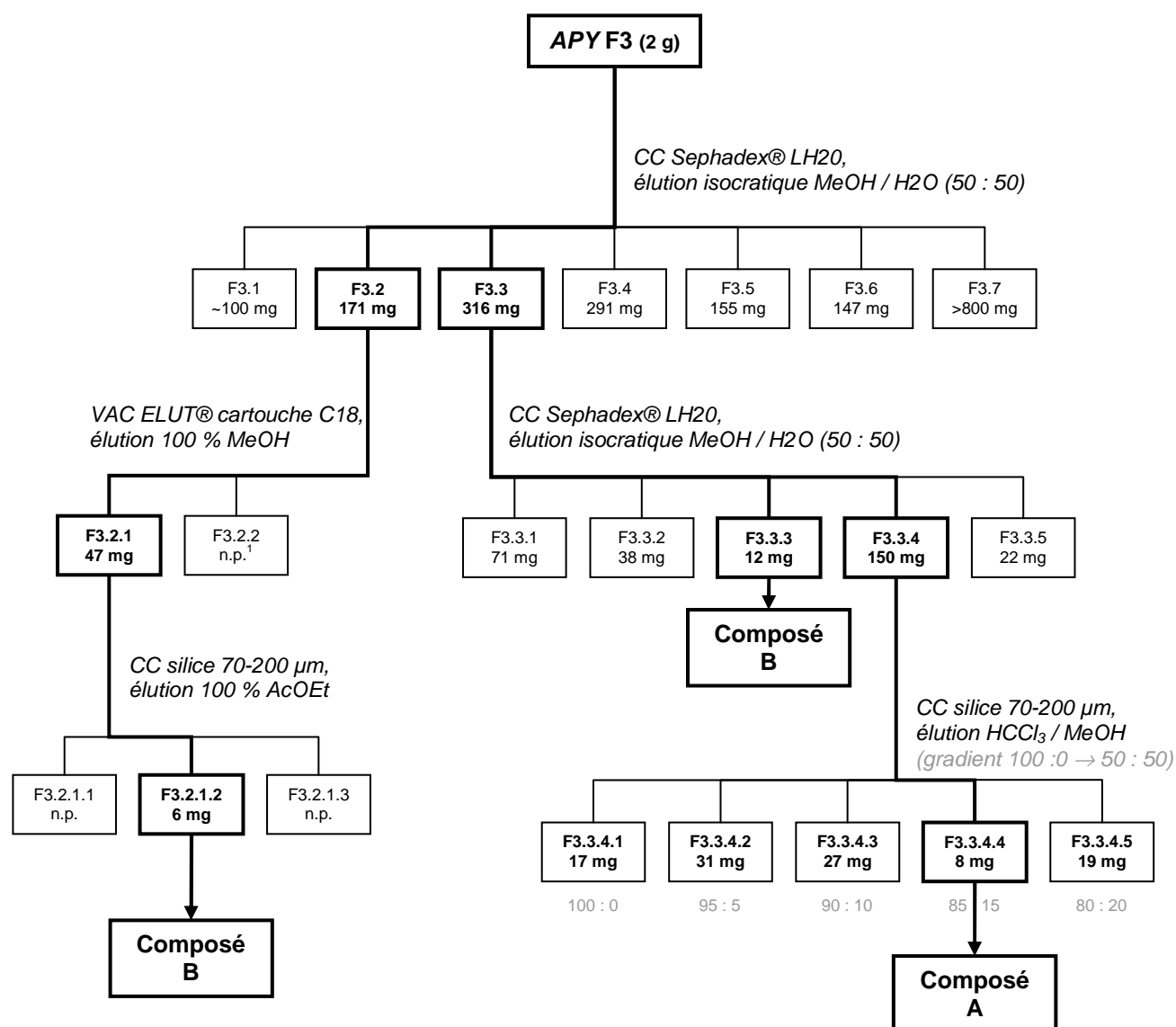
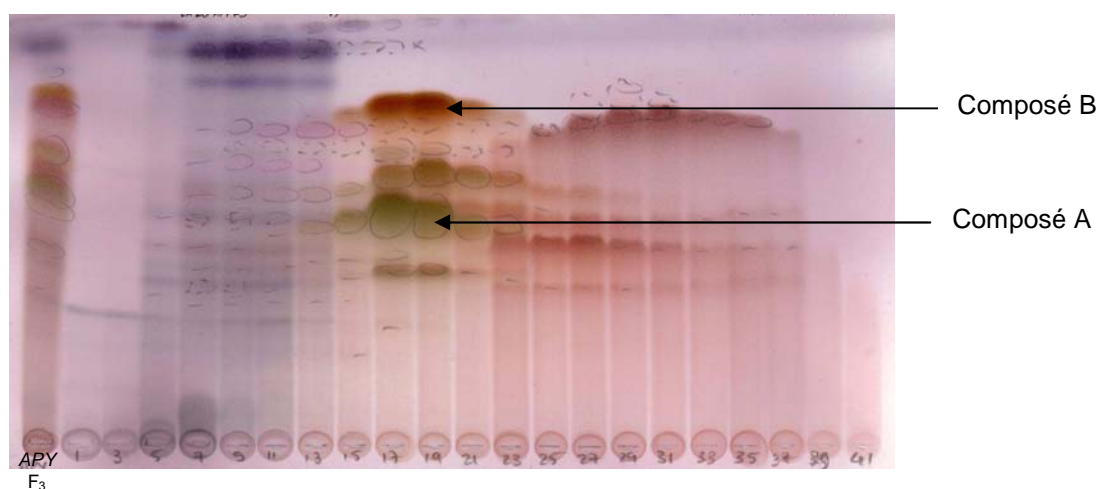
L'isolement de molécules de l'extrait **F<sub>3</sub>** de *Agauria polyphylla* s'est révélé être particulièrement difficile en raison de la présence de tanins dans l'extrait. Ces composés sont présents dans toutes les zones de polarité et présentent une grande gamme de poids moléculaires ce qui rend l'isolement de molécules pures extrêmement délicate. Par conséquent le travail préliminaire à l'étude des composés de cette plante a consisté à tester de nombreuses méthodes chromatographiques en association avec divers systèmes de solvants afin de mettre au point un système de fractionnement permettant la séparation des tanins des autres composés de l'extrait. L'alternance de chromatographies d'adsorption (en phases normale et inverse) et d'exclusion permet en partie de remédier à ce problème mais de nombreuses phases de purification sont nécessaires rendant le rendement final en composé pur très faible. Ainsi, seuls deux composés purs ont pu être isolés d'**APY F<sub>3</sub>**.

#### 2.1.2. Fractionnement de l'extrait **APY F<sub>3</sub>** et isolement des composés A à C

Le schéma de fractionnement de l'extrait **APY F<sub>3</sub>** est présenté sur la figure III 2.

La fraction **APY F<sub>3</sub>** a subi un premier fractionnement sur chromatographie d'exclusion sur gel de Sephadex® LH20 éluée avec un mélange H<sub>2</sub>O / MeOH à parts égales pour donner sept fractions (F3.1 à F3.7). Le fractionnement sur gel de Sephadex® permet de séparer les molécules d'un extrait selon leur poids moléculaire.

La figure III 3 présente un exemple de CCM bilan du fractionnement du fractionnement de **APY F** sur ce support. La fraction F3.1 contient un très grand nombre de composés présents en très faible quantité. Les fractions suivantes contiennent les tanins les plus apolaires. Il peut s'agir de monomères ou oligomères de ces composés polymérisés. La fraction F3.3 contient majoritairement des flavonoïdes ainsi que des tanins de polarités intermédiaires. Enfin, les fractions suivantes renferment les tanins de haut poids moléculaire c'est-à-dire de fort degré de polymérisation.

Figure III 2. Schéma de fractionnement de APY F<sub>3</sub>.Figure III 3. CCM du suivi de fractionnement d'APY F<sub>3</sub> sur gel de Sephadex® (élution : AcOEt / MeOH / H<sub>2</sub>O (100 : 13.5 : 10) ; révélation : réactif à la vanilline sulfurique).<sup>1</sup> n.p. = non pesé



La fraction F3.2 a subi un fractionnement sur cartouche de silice greffée C18 éluée au MeOH puis un second par chromatographie d'adsorption sur colonne de silice qui a permis d'obtenir le composé **B**. Le composé **B** a également été obtenu par le fractionnement de la fraction F3.3 par chromatographie d'exclusion sur gel de Sephadex® éluée avec MeOH / H<sub>2</sub>O (50 : 50).

La fraction F3.3.4 a elle-même subi un fractionnement par chromatographie d'adsorption sur silice, en utilisant un gradient de HCCl<sub>3</sub> / MeOH permettant ainsi d'obtenir cinq sous-fractions (figure III 2).

La sous-fraction F3.3.4.4 contenait un produit majoritaire qui a précipité en solution (HCCl<sub>3</sub> / MeOH 85 : 15) formant de petits flocons jaunes. Ce précipité a été lavé au chloroforme pour donner le composé **A**.

## 2.2. Fractionnement de l'extrait *APY F<sub>2</sub>* et isolement du composé C

Pour étudier les composés apolaires de l'extrait *APY F<sub>3</sub>*, nous avons choisi de travailler sur l'extrait *APY F<sub>2</sub>* dans lequel ces composés sont également présents mais en plus grande quantité. En outre, l'absence de tanins dans *APY F<sub>2</sub>* semblait pouvoir faciliter l'isolement de composés.

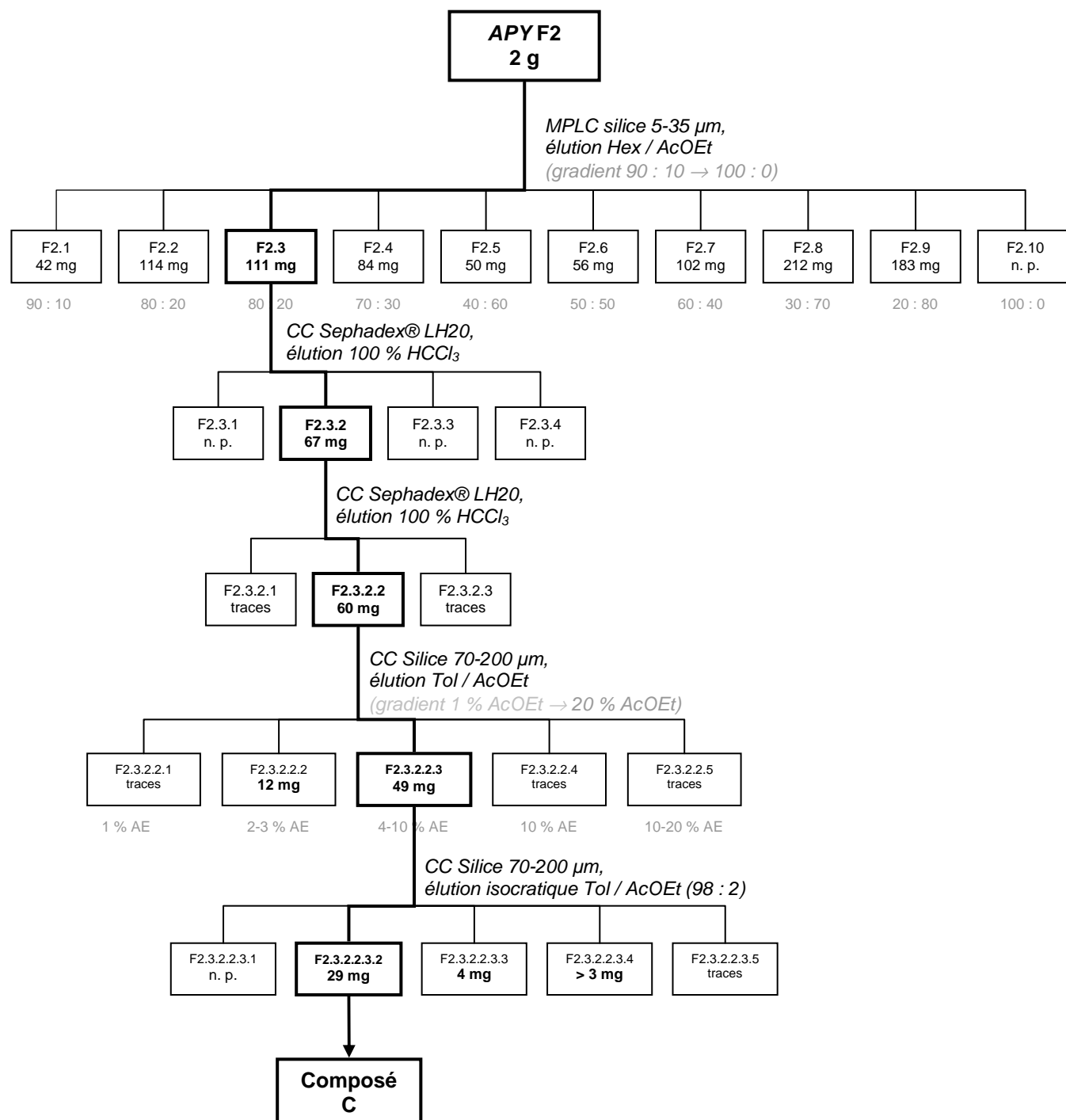


Figure III 4. Schéma de fractionnement de *APY F<sub>2</sub>*

L'extrait **APY F<sub>2</sub>** a subi un premier fractionnement par chromatographie en phase inverse (C18) moyenne pression (MPLC) à l'aide d'un gradient H<sub>2</sub>O / MeOH pour donner dix fractions (F2.1 à F2.10). La fraction F2.3 a été soumise à des fractionnements successifs par chromatographie d'exclusion sur gel de Sephadex® éluée au HCCl<sub>3</sub> puis deux chromatographies sur colonne de silice successives éluées avec Tol / AcOEt pour donner le composé **C** (figure III 4). Le composé **C** semble être le constituant majoritaire de **APY F<sub>2</sub>** et semble être présent dans **ASA F<sub>2</sub>**.

### 2.2.1. Détermination de structure des composés A, B et C de *Agauria polyphylla*

**Note.** Les constantes physiques et données spectrales des composés isolés sont présentés en annexes (chapitre VII).

#### 2.2.1.1. Détermination de structure du composé A

Le composé A se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Ce composé réagit avec le réactif de Neu en affichant une fluorescence jaune sous UV à 365 nm laissant envisager une structure de type flavonoïde. Le spectre d'absorption UV montre deux maxima à 258 et 352 nm, caractéristiques des bandes I et II d'un flavonol [Mabry *et al.*, 1970].

#### Spectrométrie de masse.

Sur le spectre de masse en electrospray en mode négatif (ESI<sup>-</sup>), nous observons un ion *quasi*-moléculaire à  $m/z$  433  $[M-H]^-$  suggérant une masse atomique de 434 u. (figure III 5).

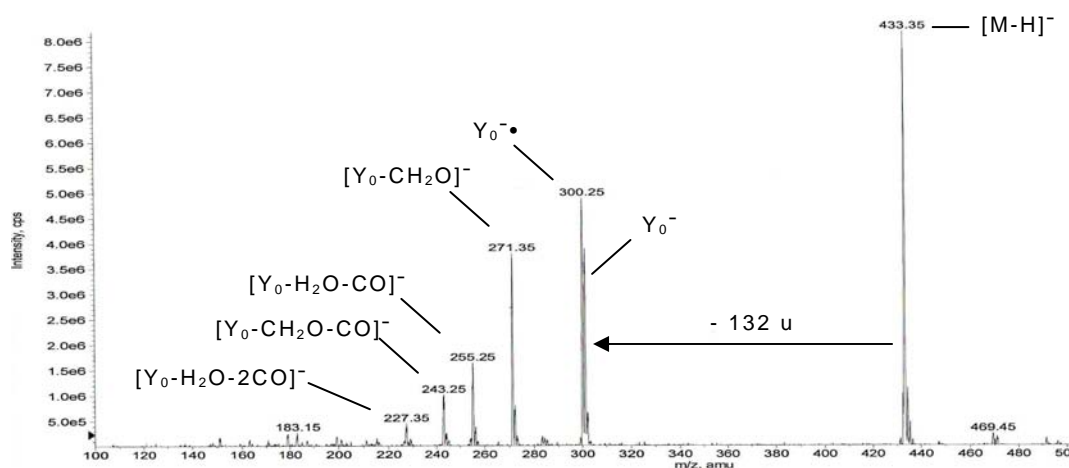


Figure III 5. Spectre de masse du composé A (ESI<sup>-</sup>, MeOH)

Comme souvent en mode négatif, la fragmentation qui a lieu dans la source fournit d'autres ions caractéristiques. En effet, on observe un ion fragment à  $m/z$  301  $[M-H-132]^-$  ou  $(Y_0^-)$  correspondant à la perte d'un pentose (-132 u) et un ion fragment à  $m/z$  300 correspondant à  $[Y_0-H]^-$ • (ou  $Y_0^\bullet$ ). D'autres ions de moindre abondance sont aussi présents à  $m/z$  271  $[Y_0-CH_2O]^-$ ,  $m/z$  255  $[Y_0-H_2O-CO]^-$  et  $m/z$  243  $[Y_0-CH_2O-CO]^-$ .

Nous pouvons en déduire que ce composé présente une génine de masse 302 u avec un double liaison entre les positions 3 et 4 (présence du radical  $Y_0^\bullet$ ). Par ailleurs, le ratio  $Y_0^\bullet/Y_0^-$  très supérieur à 1 suggère que le site de glycosylation est sur la position 3 de la génine [Hvattum et Ekeberg, 2003].

La fragmentation MS/MS de l'ion  $Y_0^-$  fait apparaître les ions  $^{1,3}A^-$  à  $m/z$  151 et ion  $^{1,2}A^-$  à  $m/z$  179 caractéristiques d'un flavonol portant deux groupements hydroxyles sur le cycle A laissant supposer une génine de type quercétine.

Ainsi, nous pouvons proposer la formule brute  $C_{20}H_{18}O_{11}$  pour le composé **A** présentant une génine flavonoïde de type quercétine, substituée par un pentose.

### Spectrométrie de RMN.

Les protons du cycle A d'un flavonoïde apparaissent sur un spectre RMN- $^1H$  entre 6 et 6.5 ppm [Mabry *et al.*, 1970]. Dans cette zone, sur le spectre de RMN- $^1H$  du composé **A**, (figure III 6), nous observons deux protons aromatiques couplant entre eux avec la même constante de couplage formant deux doublets à  $\delta_H$  6.21 et 6.40 ppm ( $J = 2.0$  Hz), typiques d'un couplage en *meta* sur un cycle aromatique. Ces signaux sont caractéristiques du cycle A d'un flavonoïde substitué en C-5 et C-7 et peuvent être attribués aux protons H-6 et H-8 respectivement [Markham, 1982].

Les protons du cycle B d'un flavonoïde sont visibles sur un spectre RMN- $^1H$  entre 6.7 et 7.9 ppm [Mabry *et al.*, 1970]. Sur le spectre de RMN- $^1H$  de **A**, nous observons la présence de trois protons aromatiques à  $\delta_H$  7.54 ppm ( $d$ ,  $J = 2.1$  Hz), 7.50 ppm ( $dd$ ,  $J = 8.3$ ,  $J = 2.1$  Hz), 6.92 ppm ( $d$ ,  $J = 8.3$  Hz) dont les constantes de couplages indiquent qu'ils forment un système ABX sur le cycle B et que celui-ci est 1', 3', 4'-trisubstitué. Ces protons sont respectivement attribués à H-2', H-6' et H-5'.

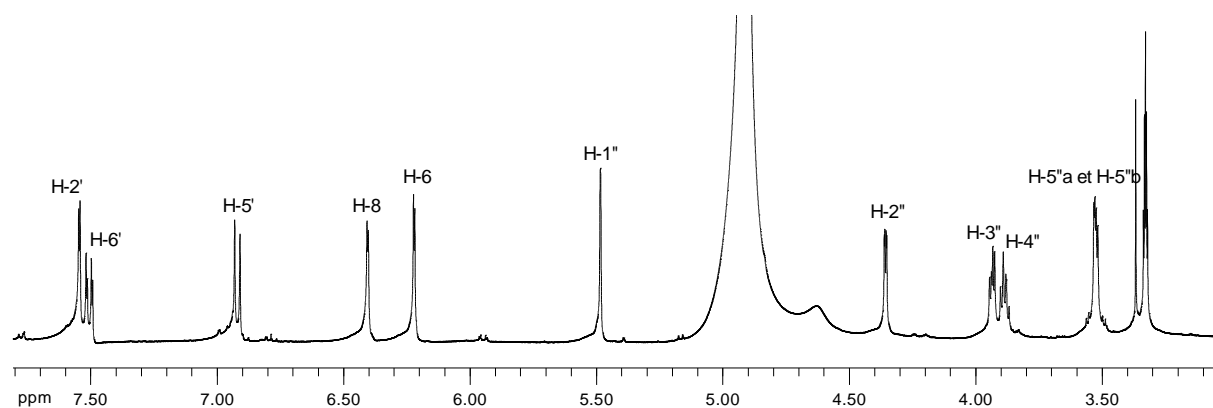


Figure III 6. Spectre de RMN- $^1H$  du composé **A** dans MeOD.

Le signal à  $\delta_H$  5.48 peut correspondre au proton anomérique du glycoside. Cinq autres signaux sont présents sur le spectre de RMN- $^1H$  de **A** (figure III 6) et correspondent sans doute aux protons de la partie osidique.

Le spectre de RMN- $^{13}C$  du composé **A** présente vingt signaux distincts dont quinze correspondant aux signaux d'un flavonoïde. Parmi ceux-ci, nous distinguons dix carbones quaternaires dont un groupement carbonyle ( $\delta_C$  178.8 ppm) et le carbone 3 caractéristique d'un flavonol ( $\delta_C$  133.7 ppm), et cinq CH aromatiques (figure III 7).

A ce stade, nous pouvons formellement identifier cette génine de type flavonol comme étant la quercétine (masse 302 u et hydroxylations en positions 5, 7, 3', 4' et 3).

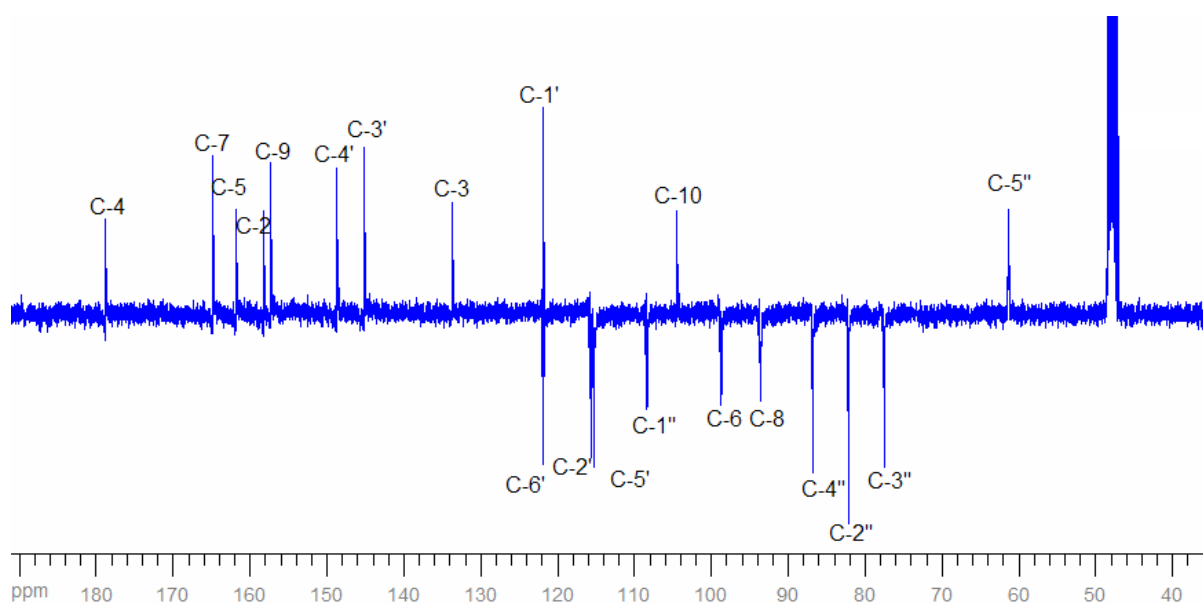


Figure III 7. Spectre de RMN-<sup>13</sup>C du composé A dans MeOD.

Le spectre de RMN-<sup>13</sup>C de **A** présente cinq signaux de CH et un CH<sub>2</sub> dans la région des sucres indiquant la présence d'un pentose. Nous pouvons l'identifier comme étant un arabinofuranose grâce aux déplacements chimiques  $\delta_C$  82.1, 77.5, 86.8 et 61.4 ppm pour, respectivement, les carbones C-2'', C-3'', C-4'' et C-5'' [Markham *et al.*, 1978 ; Agrawal, 1992]. Le déplacement caractéristique du carbone C-1'' ( $\delta_C$  108.5 ppm) ainsi que le déplacement chimique du proton H-1'' ( $\delta_H$  5.48 ppm) et sa faible constante de couplage ( $J = 1.0$  Hz) observés sur le spectre de RMN-<sup>1</sup>H indiquent un anomérie  $\alpha$  pour ce sucre.

Toutes les valeurs de protons et de carbones ont été attribuées d'après l'analyse des spectres de RMN 2D de corrélation homonucléaire COSY et hétéronucléaires HSQC et HMBC (figure III 8) ainsi qu'en comparant ces données avec celles de la littérature [Servettaz *et al.*, 1984].

Le site de glycosylation de l'arabinofuranose sur la génine quercétine a été finalement déterminé grâce à la corrélation entre le proton anomérique du sucre et le carbone en position 3 de la quercétine (figure III 8).

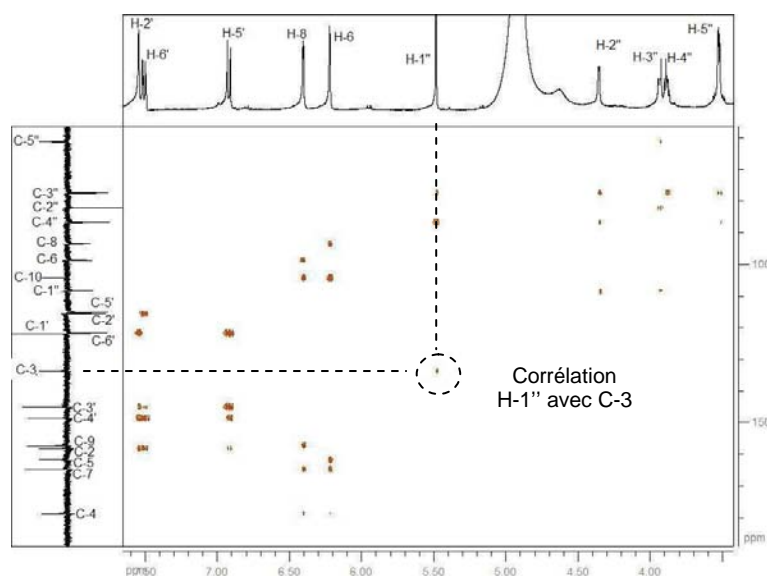


Figure III 8. Spectre HMBC du composé A.

La molécule **A** est donc identifiée comme étant la **quercétine-3-*O*- $\alpha$ -arabinofuranoside** ou avicularine, une molécule très répandue dans les *Ericaceae*.

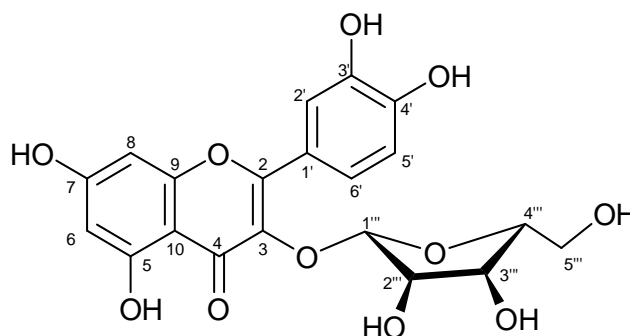


Figure III 9. Structure de la quercétine-3-*O*- $\alpha$ -arabinofuranoside (composé A).

### 2.2.1.2. Détermination de structure du composé B

Le composé **B** se présente sous forme d'une poudre brun rougeâtre soluble dans le méthanol et partiellement soluble dans l'eau. Le spectre UV du composé **B** présente deux maxima à 226 et 278 nm. Les données du spectre IR (*cf.* chapitre VII) suggèrent que, contrairement au composé **A**, le composé **B** ne présente pas de groupement C=O.

#### Spectrométrie de masse.

L'analyse du spectre de masse en electrospray en mode négatif du composé **B** (figure III 10) permet d'observer un ion *quasi* moléculaire à  $m/z$  289  $[M-H]^-$  suggérant une masse molaire de 290 u. L'ion de faible intensité observé à  $m/z$  579 peut correspondre au dimère du composé formé dans la source  $[2M-H]^-$ .

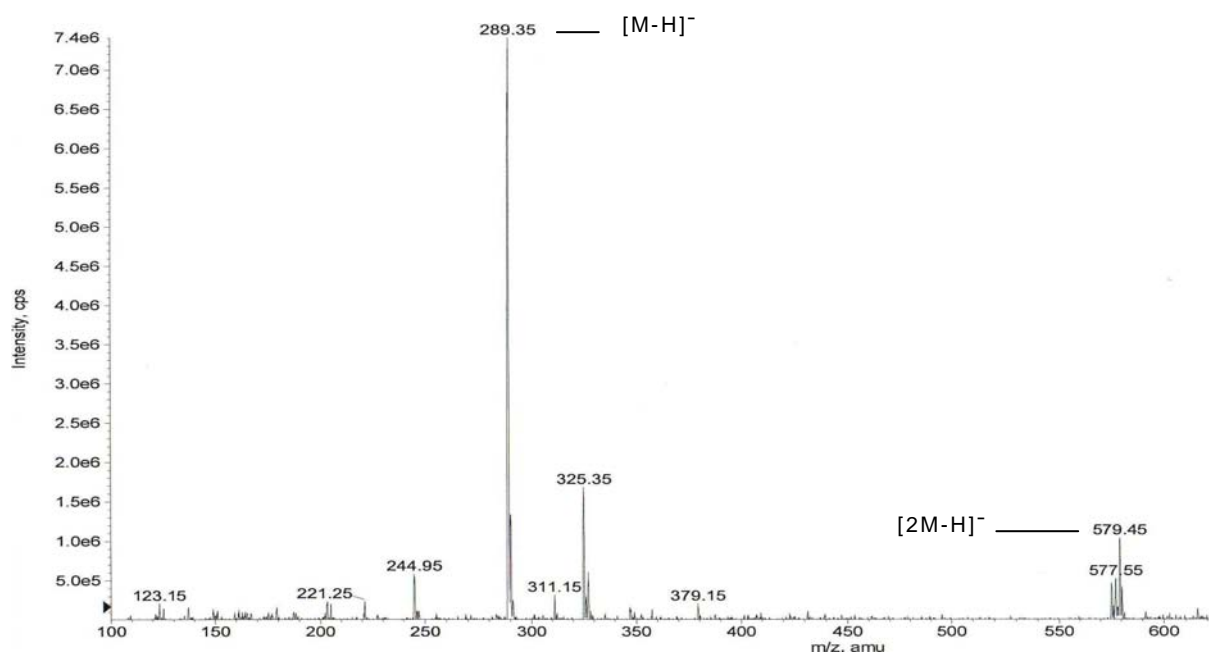


Figure III 10. Spectre de masse ESI<sup>-</sup> du composé **B** (MeOH).

#### Spectrométrie de RMN.

Le spectre de RMN-<sup>1</sup>H du composé **B** (figure III 11) présente des similitudes avec celui du composé **A**. En effet, nous retrouvons les signaux des protons aromatiques des cycles A et B d'un flavonoïde substitué en 5, 7, 3' et 4' : H-6  $\delta_H$  5.95 ppm (*d*,  $J = 2.3$  Hz), H-8  $\delta_H$  5.93 ppm (*d*,  $J = 2.3$  Hz), H-2'  $\delta_H$  6.99 ppm (*d*,  $J = 2.0$  Hz), H-5'  $\delta_H$  6.77 ppm (*d*,  $J = 8.2$  Hz) et H-6'  $\delta_H$  6.81 ppm (*ddd*,  $J = 8.2$  Hz,  $J = 2.0$  Hz,  $J = 0.6$  Hz).

Ce dernier proton forme un doublet dédoublé dédoublé de faible constante de couplage ( $J = 0.6$  Hz) qui ne se retrouve pas pour un autre proton du cycle aromatique. Nous envisageons la présence d'un groupement CH en position 2 et donc l'absence de double liaison entre les positions 2 et 3.



Sur le spectre de RMN- $^1\text{H}$  du composé **B**, nous observons également les signaux de deux protons à  $\delta_{\text{H}}$  2.88 et 2.75 ppm formant des doublets dédoublés dont l'une des constantes de couplage  $J = 16.7$  Hz est caractéristique d'un couplage géminal. Il peut donc s'agir de deux protons non équivalents d'un  $\text{CH}_2$ .

Par ailleurs, ces deux protons couplent tous les deux avec le proton d'un groupement hydroxyle à  $\delta_{\text{H}}$  4.19 formant un doublet dédoublé de constantes de couplage  $J = 4.5$  Hz et  $J = 3.0$  Hz. Ce signal est encore dédoublé par la présence d'un autre proton ( $J = 1.5$  Hz) fortement déblindé dont le signal, sur le spectre de RMN- $^1\text{H}$  se présente sous la forme d'un singulet élargi à  $\delta_{\text{H}}$  4.83.

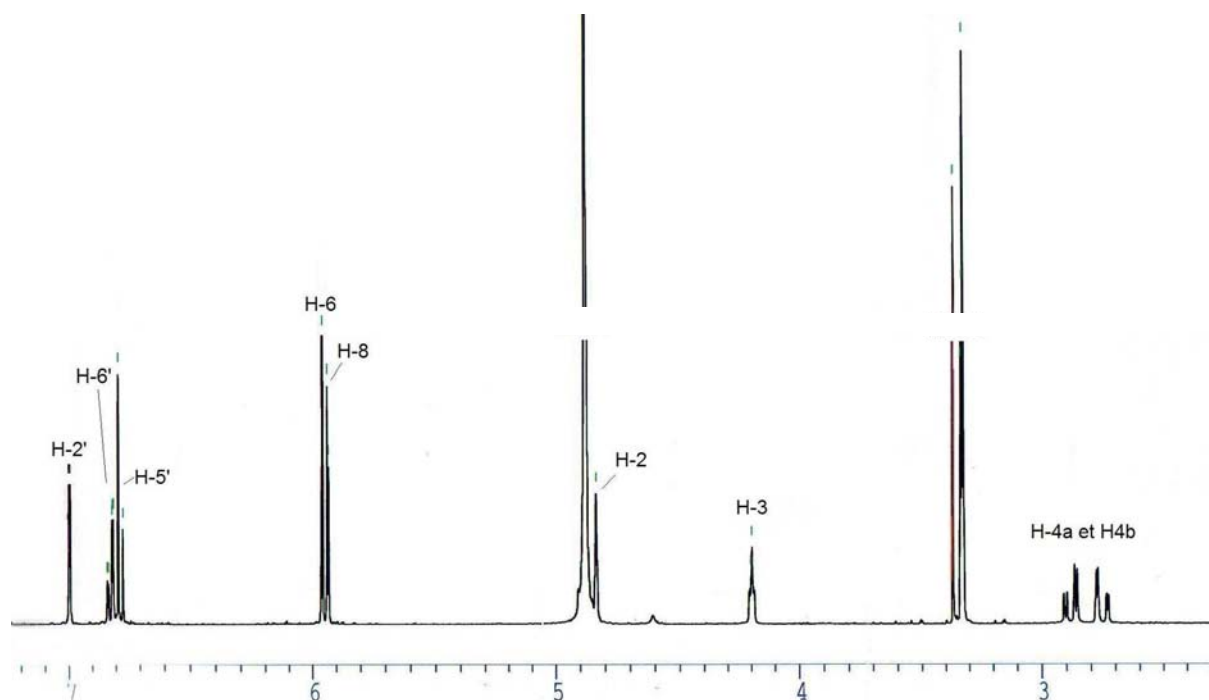


Figure III 11. Spectre de RMN- $^1\text{H}$  du composé **B** dans MeOD.

Tenant compte des informations apportées par la spectrométrie infra-rouge et par la RMN du proton, nous pouvons affirmer que le composé **B** présente les caractéristiques d'un flavonoïde sans groupement carbonyle, ce qui nous oriente vers une structure de type flavane substituée en position 3 c'est-à-dire une structure de type catéchine.

L'étude du spectre de RMN- $^{13}\text{C}$  de **B** apporte des informations complémentaires en affichant quinze signaux (figure III 12). Nous observons sept carbones quaternaires aromatiques ainsi que cinq CH aromatiques que nous pouvons attribuer aux cycles A et B d'un flavonoïde substitué en 5, 7, 3' et 4'. Le spectre HSQC nous permet d'attribuer les trois signaux restant à un CH substitué par un hétéroatome ( $\delta_{\text{C}}$  78.5 /  $\delta_{\text{H}}$  4.83 ppm), un groupe  $\text{CHOH}$  ( $\delta_{\text{C}}$  66.0 /  $\delta_{\text{H}}$  4.19 ppm) et un groupe  $\text{CH}_2$  ( $\delta_{\text{C}}$  27.9 /  $\delta_{\text{H}}$  2.88 et 2.75 ppm).

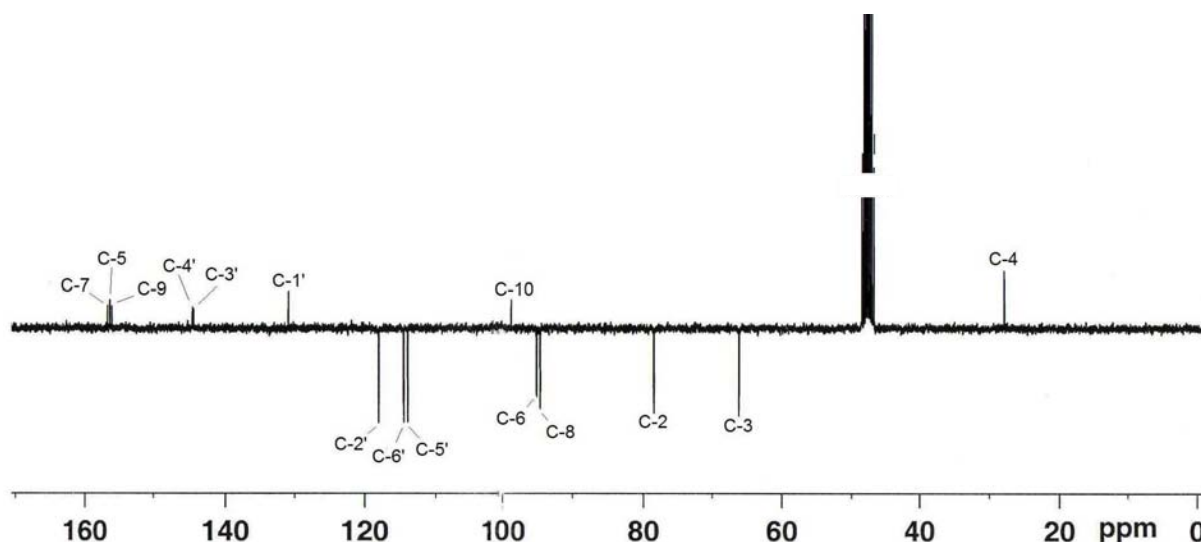


Figure III 12. Spectre de RMN- $^{13}\text{C}$  de **B** dans MeOD.

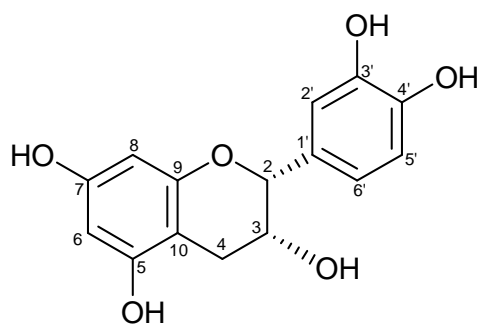
Compte tenu des informations tirées du spectre HSQC de **B** et des données de la spectrométrie de masse, la formule brute du composé **B** semble être  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ .

Les corrélations présentes sur le spectre HMBC nous permettent de confirmer les attributions des signaux des cycles A et B et de confirmer la structure de type catéchine. En effet nous observons des corrélations entre C-10 et les deux protons portés par C-4, C-1 et le proton à  $\delta_{\text{H}}$  4.83 ppm (C-2), ainsi que entre C-2 et le proton à  $\delta_{\text{H}}$  4.19 (H-3). Ainsi, le déblindage du proton H-2 et celui de H-3 sont expliqués par la présence d'un groupement hydroxyle en position 3.

Le composé **B** est donc de type catéchique substitué par des groupements hydroxyles en positions 5, 7, 3', 4' et 3. L'analyse de la constantes de couplage observée entre les protons H-2 et H-3 ( $J = 1.5 \text{ Hz}$ ) indique que ces protons sont en position *cis* et permet de placer le groupement hydroxyle en position  $\beta$  [Davis et al., 1996].

Nous avons mesuré le pouvoir rotatoire du composé **B** dans le MeOH et observé la valeur  $[\alpha]_{\text{D}} - 55^\circ$ . Ainsi, en comparaison avec les données de la littérature, nous pouvons identifier le composé **B** comme étant la (-)-épicatechine (figure III 13) [Davis et al., 1996 ; Miketova et al., 1998].

Dans l'extrait **APY F<sub>3</sub>**, le composé **B** appartient aux composés les plus apolaires parmi ceux que nous qualifions de tanins. Il s'agit en fait de l'unité de base de tanins catéchiques, encore appelés proanthocyanidols. Grâce à cette identification, la présence de proanthocyanidols est avérée dans les plantes du genre *Agauria*.



**Figure III 13. Structure de la (-)-épicatéchine (composé B).**

### 2.2.1.3. Détermination de structure du composé C

Le composé **C** se présente sous la forme d'une poudre blanche, soluble dans le chloroforme et dans les solvants apolaires. Ce composé prend une coloration violette après révélation en CCM par de la vanilline sulfurique et une coloration bleue au réactif de Liebermann-Burchard suggérant un composé de type triterpénique.

#### Spectrométrie de masse.

La mesure du spectre de masse en ionisation impact électronique (EI) en mode positif (figure III 14) montre un ion à  $m/z$  426 qui correspond à l'ion moléculaire  $M^+$ . Le spectre du composé **C** présente également des ions résultant de la fragmentation de la molécule et notamment l'ion **B** à  $m/z$  207 qui est caractéristique des cycles A et B d'un triterpène (voir schéma figure III 14) [Budzikiewicz *et al.*, 1963][Ullah *et al.*, 1999] ; la perte par cet ion d'une molécule d'eau indique que les cycles A et B portent un groupement hydroxyle, très probablement en position 3 pour des raisons biogénétiques.

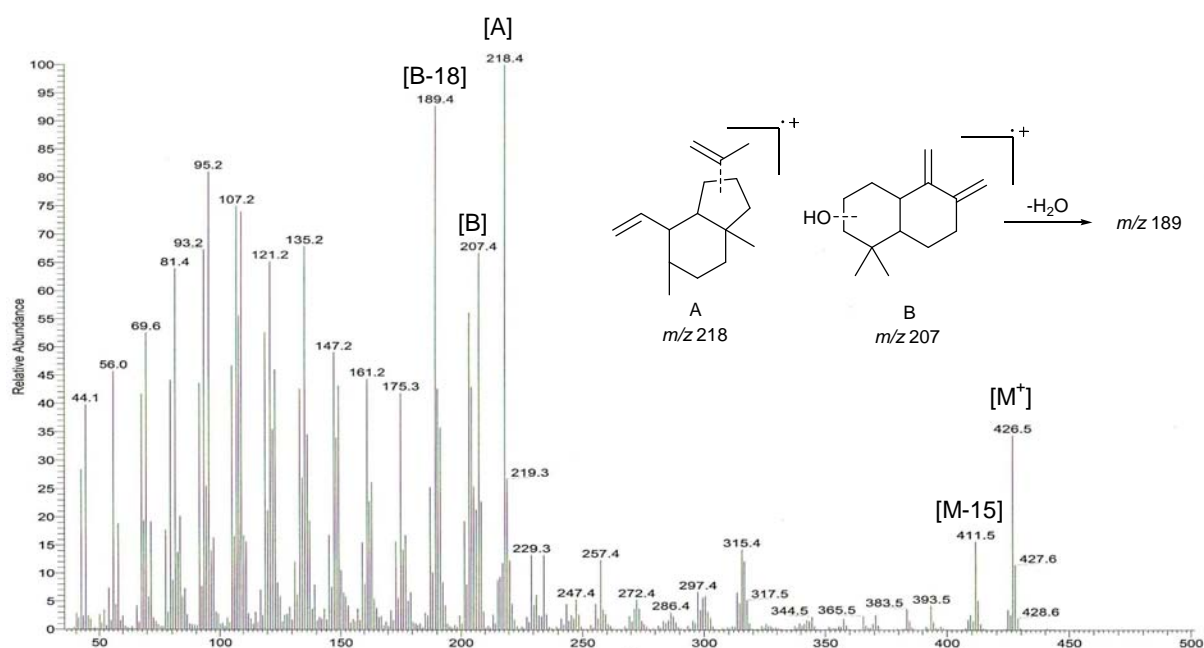


Figure III 14. Spectre de masse EI du composé **C**. (DCM, mode positif)

#### Spectrométrie de RMN.

La majorité des signaux du spectre RMN- $^1\text{H}$  du composé **C** (figure III 15) est observée dans la région des hauts champs indiquant la présence de protons aliphatiques. Parmi ceux-ci, le spectre présente un profil typique de triterpène avec la présence de sept groupements méthyles : six formant des singulets ( $\delta_{\text{H}}$  1.05, 0.98, 0.96, 0.84, 0.81 et 0.77 ppm) et un formant un doublet dédoublé à  $\delta_{\text{H}}$  1.70 ppm ( $dd$ ,  $J = 1.3$  Hz,  $J = 0.6$  Hz) [Karliner et Djerassi, 1966].

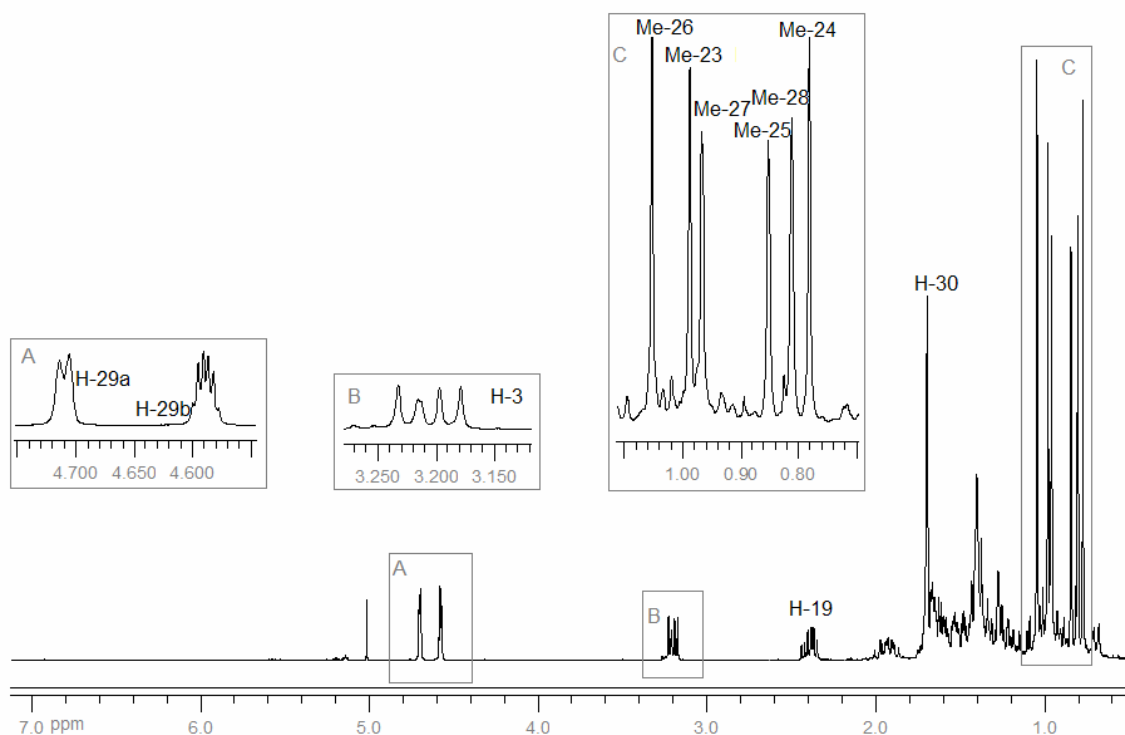


Figure III 15. Spectre RMN- $^1\text{H}$  du composé **C** dans  $\text{CDCl}_3$ .

Nous observons également la présence du signal d'un groupement hydroxyle à  $\delta_{\text{H}}$  3.20 ppm et des signaux de deux protons oléfiniques à  $\delta_{\text{H}}$  4.58 et 4.71 ppm.

Les 30 signaux du spectre RMN- $^{13}\text{C}$  du composé **C** confirment la présence d'un triterpène avec sept méthyles dont l'expérience HSQC a permis de définir les corrélations protons ( $\delta_{\text{C}}$  28.0 /  $\delta_{\text{H}}$  1.70,  $\delta_{\text{C}}$  15.4 /  $\delta_{\text{H}}$  0.81,  $\delta_{\text{C}}$  16.1 /  $\delta_{\text{H}}$  0.96,  $\delta_{\text{C}}$  16.0 /  $\delta_{\text{H}}$  1.05,  $\delta_{\text{C}}$  14.6 /  $\delta_{\text{H}}$  0.84,  $\delta_{\text{C}}$  18.0 /  $\delta_{\text{H}}$  0.77 et  $\delta_{\text{C}}$  19.3 /  $\delta_{\text{H}}$  0.98 ppm). Par ailleurs, nous observons la présence d'un carbone quaternaire oléfinique à  $\delta_{\text{C}}$  151.0 ppm et d'un carbone secondaire oléfinique à  $\delta_{\text{C}}$  109.3 ppm.

Les déplacements chimiques du CH à  $\delta_{\text{C}}$  79.0 /  $\delta_{\text{H}}$  3.20 ppm confirme la présence d'un groupement hydroxyle.

Les signaux d'un CH à  $\delta_{\text{C}}$  55.3 /  $\delta_{\text{H}}$  0.70 ppm sont caractéristiques du CH-5 d'une *trans*-décaline A/B [Mahato et Kundu, 1994].

L'observation conjointe des spectres de RMN- $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  nous indique la présence des signaux caractéristiques d'un groupement isoprène. En effet, les deux protons du  $\text{CH}_2$  oléfinique ( $\delta_{\text{C}}$  109.3 /  $\delta_{\text{H}}$  4.58 et 4.71 ppm) couplent entre eux formant chacun un doublet ( $J = 2.5$  Hz) dédoublé par le couplage avec les protons du méthyle à  $\delta_{\text{H}}$  1.70 ppm (*dd*,  $J = 1.3$  Hz,  $J = 0.6$  Hz).

Toutes ces informations nous permettent de déduire la formule brute du composé **C**  $C_{30}H_{50}O$  et de calculer les équivalents de doubles liaisons (EDL) afin d'envisager le nombre de liaisons conjuguées et/ou de cycles que compte la structure. La formule brute indique 6 degrés d'insaturations, nous pouvons émettre l'hypothèse que le composé **C** est un triterpène pentacyclique dont le cycle E est à 5 liaisons et est substitué par un groupement isoprényle. Le composé **C** peut donc être de type lupane ou hopane [Mahato et Kundu, 1994].

Toutes les autres valeurs de protons et de carbones ont été attribuées d'après l'analyse des spectres COSY, HSQC et HMBC (figure III 17), elles concordent avec une structure de type lupène. [Ammann *et al.*, 1982 ; Reynolds *et al.*, 1986].

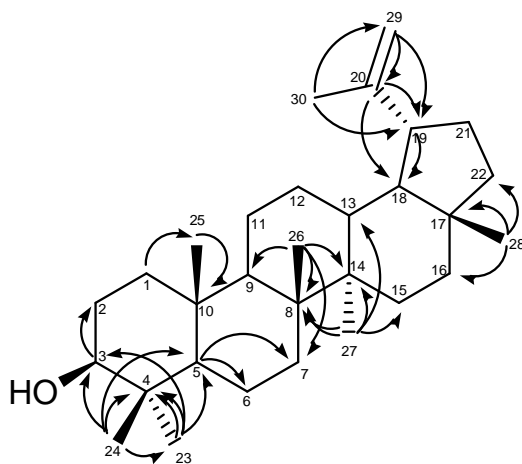


Figure III 16. Illustrations des principales corrélations observées sur le spectre HMBC.

En effet, en raison de l'éloignement de la chaîne latérale à trois carbones dans le squelette hopène (figure III 18), les C-13 et Me-27 sont beaucoup plus déblindés que dans le squelette lupane [Mahato et Kundu, 1994].

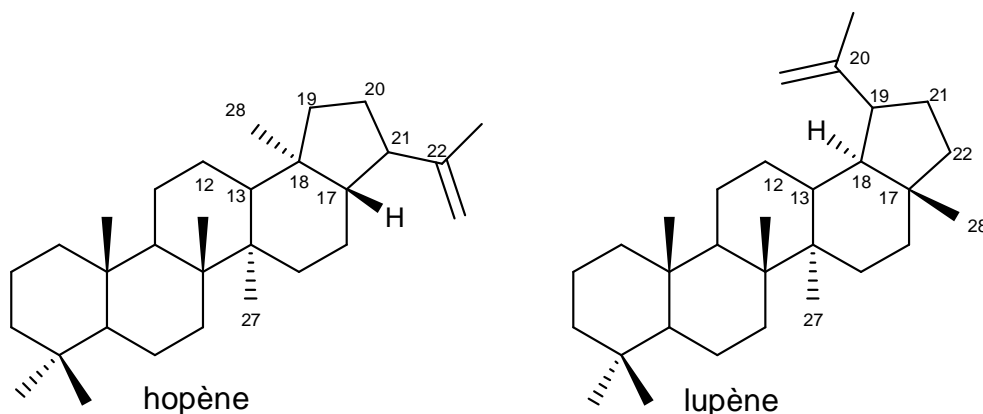


Figure III 17. Squelettes de hopène et lupène.

Pour le composé **C**, le déplacement du C-13 est de  $\delta_C$  38.1 ppm alors qu'on observerait une valeur d'environ 50 ppm dans le cas d'un hopène ; de la même manière, le Me-27 à  $\delta_C$  14.6 dans le composé

**C** serait plus déblindé ( $\delta_C \sim 18$  ppm) dans une structure de type hopène [Meselhy et Aboutabl, 1997 ; Endale *et al.*, 2005].

Le déplacement à  $\delta_H$  2.40 ppm est caractéristique du H-19 d'un lupène [Culioli *et al.*, 2003]. Les corrélations observées sur le spectre HMBC entre d'une part H-19 et C-20 et d'autre part entre H-30, H-29 et C-19 ( $\delta_C$  47.9 ppm) permettent de confirmer que le groupement isoprène est porté par le carbone C-19.

Les valeurs des constantes de couplage entre H-3 et les protons H-2 (*dt*,  $J = 11.3$  Hz,  $J = 5.1$  Hz) impliquent un couplage *trans-diaxial* entre H-3 et le proton H-2 *axial* permettant de placer le groupement hydroxyle OH-3 en position  $\beta$  *equatorial*. La configuration  $\beta$ -orientée de ce groupement est confirmée par le déplacement chimique du C-3 à  $\delta_C$  79.0 ppm (alors qu'elle serait proche de 76 ppm dans le cas d'une orientation  $\alpha$ ) [Mahato et Kundu, 1994].

Sur le spectre NOESY, les corrélations entre H-3 $\alpha$  et Me-23 et H-5 et H-9 suggèrent une configuration  $\alpha$  pour ces groupements, en accord avec la présence d'une *trans*-décالية. Le groupement Me-25 est positionné en axial ( $\beta$ ) dans une *trans*-décالية. La position  $\alpha$  du groupement isoprène a été déduite de la corrélation spatiale, sur le spectre NOESY, entre le proton H-19 et le signal du proton à  $\delta_H$  0.81 ppm (Me-28) positionné en via les corrélations nOe entre Me-25, Me-26 et Me-28 (figure III 19).

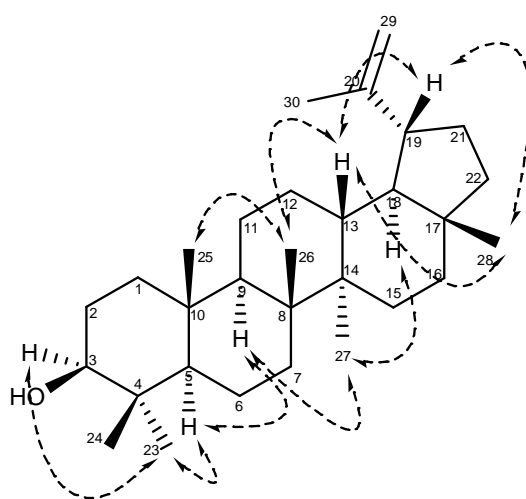


Figure III 18. Illustrations des principales corrélations observées sur le spectre NOESY.

En comparant ces données avec celles de la littérature, nous pouvons identifier le composé **C** au (20)29-lupén-3 $\beta$ -ol ou lupéol [Pereira *et al.*, 1996 ; Ali *et al.*, 1997 ; Mutai *et al.*, 2004].

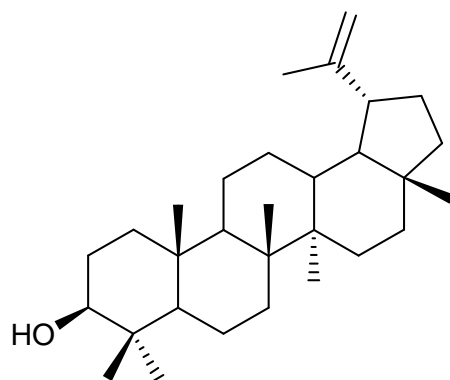


Figure III 19. Structure du (20)29-lupén-3 $\beta$ -ol (composé C).



## 2.3. *Agauria salicifolia* (ASA)

### 2.3.1. Fractionnement de l'extrait ASA F<sub>1</sub> et isolement du composé D

Comme nous l'avons vu au chapitre I., nous avons choisi d'étudier la composition chimique de l'extrait hydroalcoolique de ASA pour établir un parallèle avec la composition d'APY. Nous avons tenté d'isoler en particulier le composé apolaire qui, en CCM, semble n'être présent que dans ASA.

Pour cela, l'extrait ASA F<sub>1</sub> a été séparé par chromatographie à moyenne pression (MPLC) en phase inverse C18, éluée avec un gradient H<sub>2</sub>O / MeOH. Dix fractions (F1.1 à F1.10) ont été obtenues (figure III 21).

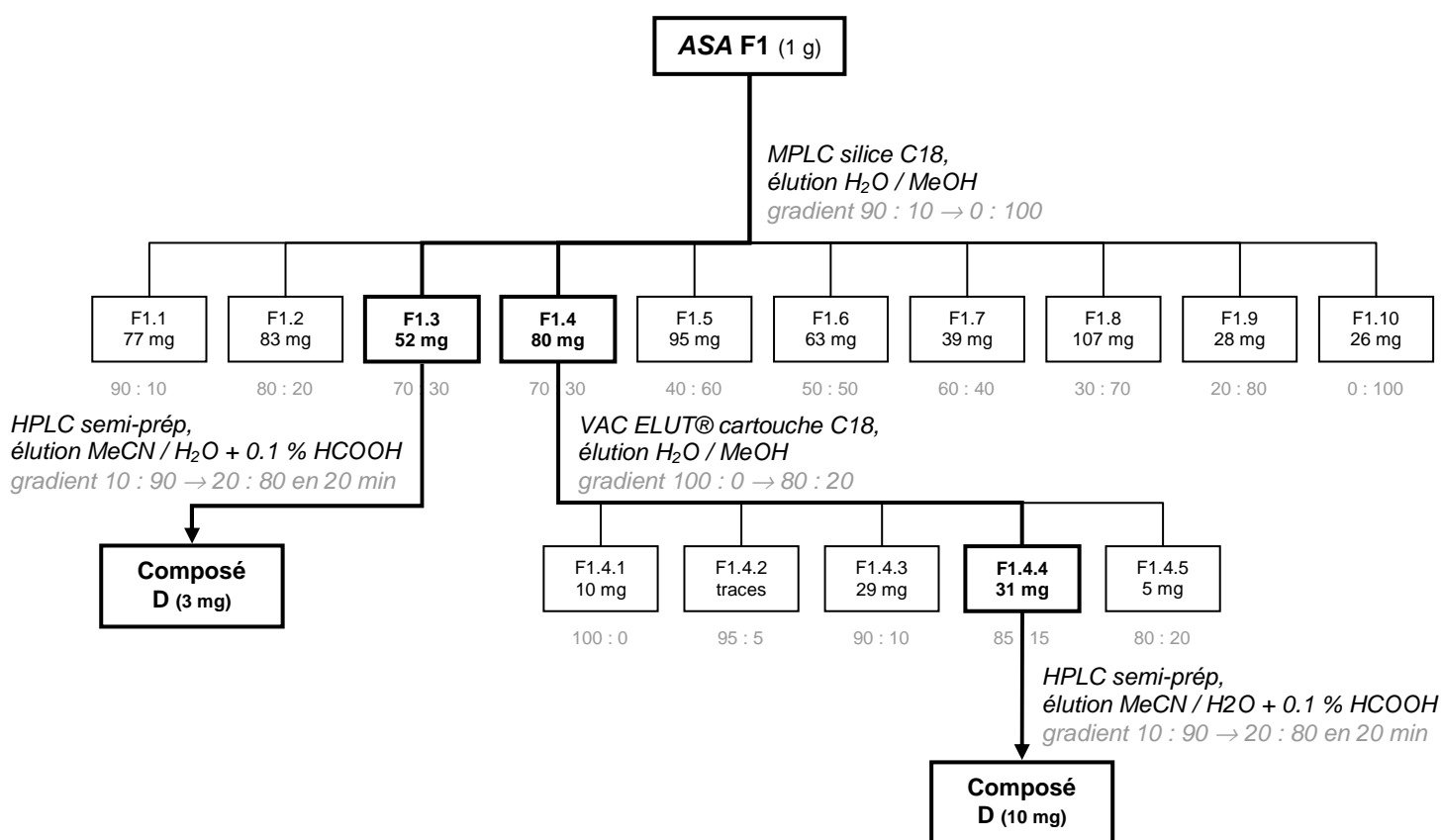


Figure III 20. Schéma de fractionnement de ASA F<sub>1</sub>

Le composé que nous cherchons à isoler, appelé composé **D**, est présent dans les fractions F1.3 et F1.4. La fraction F1.3 a donc été fractionnée par HPLC semi-préparative en phase inverse (cf. Chapitre IV). La phase mobile consistait en un gradient de MeCN / Acide formique 0.1 % dans l'eau de 10 : 90 à 20 : 80 en 20 minutes. Le composé **D** est élué à 18 minutes. Cette purification ne nous a permis de recueillir que 3 mg de **D**.

La fraction F1.4 a subi un nouveau fractionnement sur silice en phase inverse sur cartouche à l'aide d'une unité de filtration Vac Elut® éluée par un gradient H<sub>2</sub>O / MeOH. La fraction F1.4.4, enrichie en

composée D, a été purifiée par HPLC semi-préparative en utilisant la méthode citée précédemment. Cette étape a conduit à l'obtention d'environ 10 mg de composé **D** pur (figure III 21).

### 2.3.2. Détermination de structure du composé **D** de *Agauria salicifolia*

Le composé **D** se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans l'eau. Ce composé réagit avec le réactif de Neu en affichant une fluorescence jaune sous UV à 365 nm laissant envisager une structure de type flavonoïde. Les bandes de maxima d'absorption présentes sur le spectre UV du composé **D** à 254 et 346 nm sont caractéristiques d'un flavonol.

#### Spectrométrie de masse.

Le spectre en  $\text{ESI}^-$  montre un ion *quasi*-moléculaire  $[\text{M}-\text{H}]^-$  à  $m/z$  477 suggérant une masse atomique de 478 u. La présence du fragment de la génine à  $m/z$  301 indique une perte de 176 u pouvant correspondre à la perte d'un acide glucuronique (figure III 22).

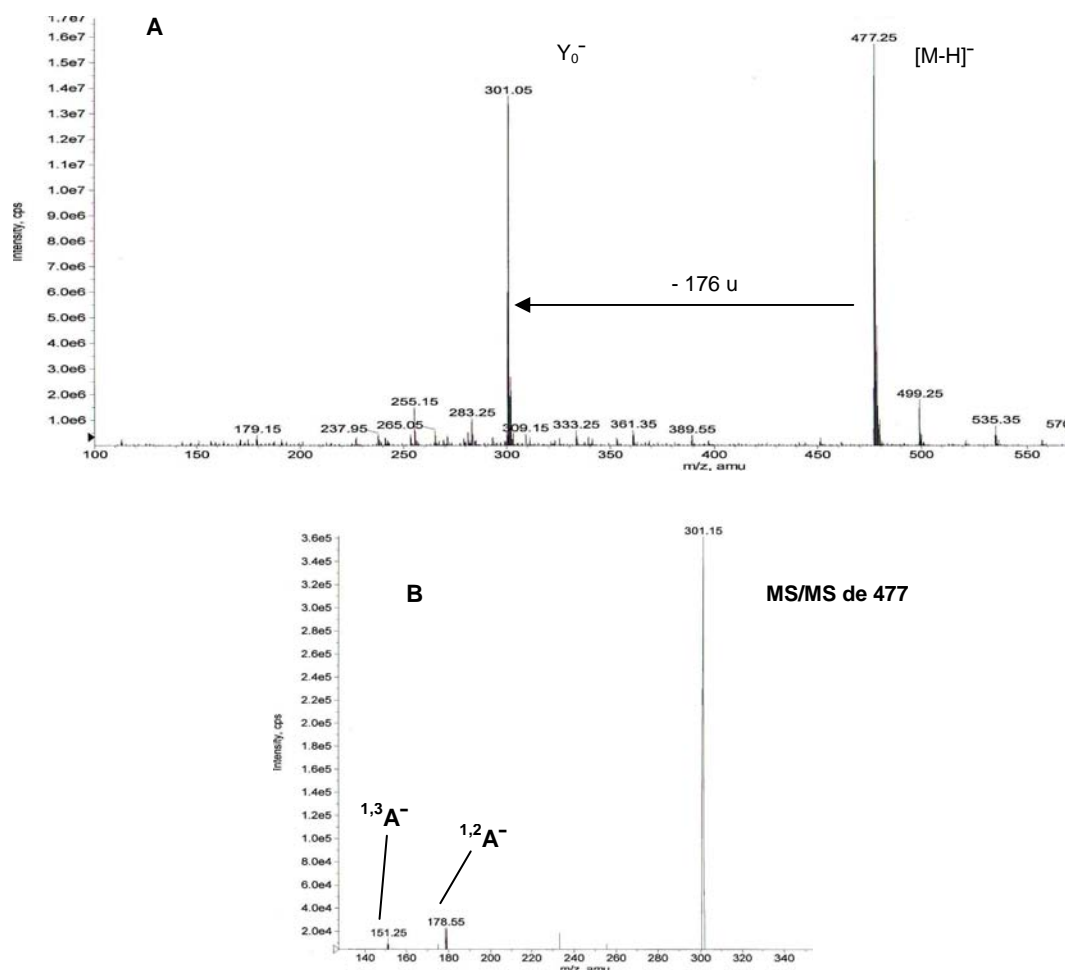


Figure III 21. A. Spectre de masse du composé **D** ( $\text{ESI}^-$ , MeOH). B. Spectre MS/MS de l'ion 477 ( $\text{ESI}^-$ , MeOH).

La fragmentation MS/MS de l'ion  $[\text{M}-\text{H}]^-$  engendre les pics d'ions fragments à  $m/z$  301 ( $Y_0^-$ ), 179 ( $1,2\text{A}^-$ ) et 151 ( $1,3\text{A}^-$ ). Grâce à ces ions caractéristiques, nous supposons la présence d'une génine

quercétine mais cette fois substituée par un acide glucuronique et déduisons la formule brute  $C_{21}H_{18}O_{13}$  pour le composé **D**.

### Spectrométrie de RMN.

Tout comme pour le composé **A**, le spectre de RMN- $^1H$  de **D** comporte, dans la zone des champs faibles, les signaux des protons aromatiques des cycles A et B d'un flavonoïde et, à champs intermédiaires, les signaux d'un sucre. Le proton anomérique de ce sucre est visible à  $\delta_H$  5.38 ppm et forme un doublet de constante de couplage  $J = 7.4$  Hz. Les signaux aromatiques sont en conformité avec une génine de type quercétine (figure III 23).

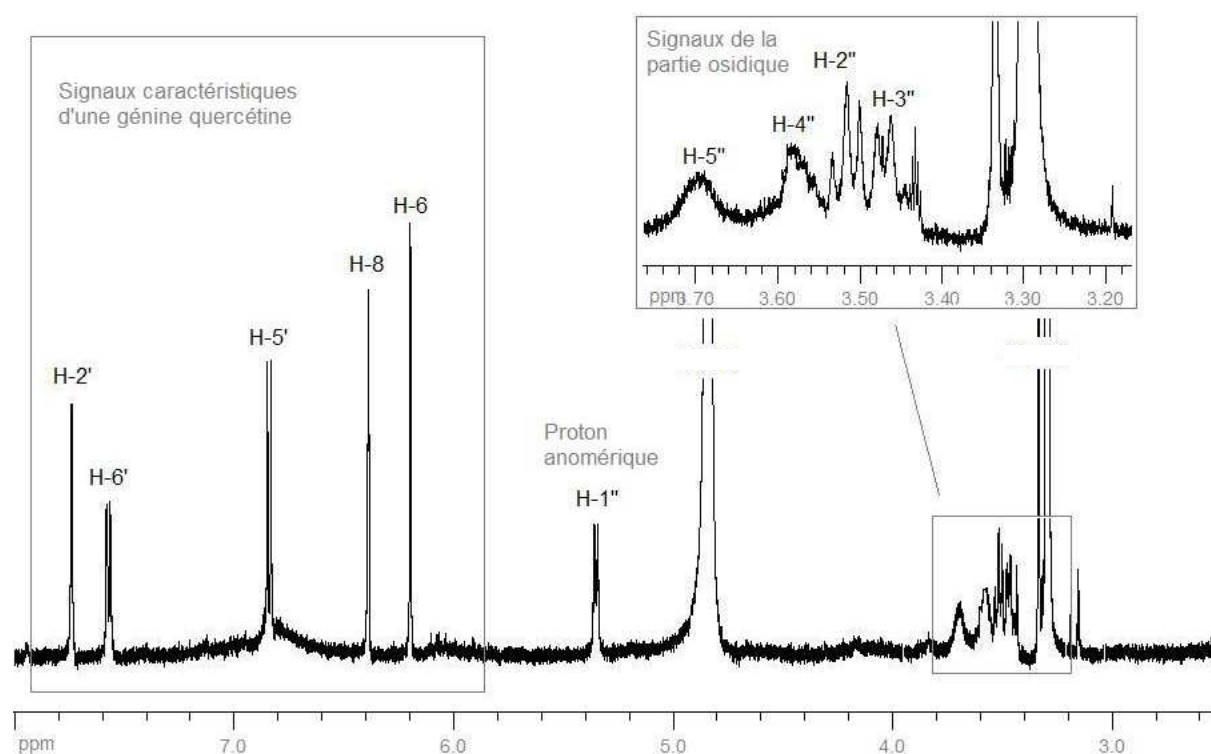


Figure III 22. Spectre RMN- $^1H$  du composé **D** dans MeOD.

Le spectre de RMN- $^{13}C$  du composé **D** montre vingt et un signaux (figure III 24). L'étude des quinze signaux en dehors de la région des sucres, en comparaison avec ceux du composé **A**, confirme que la génine du composé **D** est la quercétine.

Les six signaux restant sur le spectre appartiennent au sucre, il s'agit donc bien d'un hexose. La présence sur le spectre RMN- $^{13}C$  d'un second carbonyle à  $\delta_C$  173.2 ppm renforce l'hypothèse émise d'après l'étude du composé **D** en spectrométrie de masse de la présence d'un substituant acide uronique. L'analyse conjointe des spectres de RMN- $^1H$ , RMN- $^{13}C$ , HSQC et HMBC montre qu'il s'agit des signaux caractéristiques d'un acide glucuronique [Parejo *et al.*, 2004].

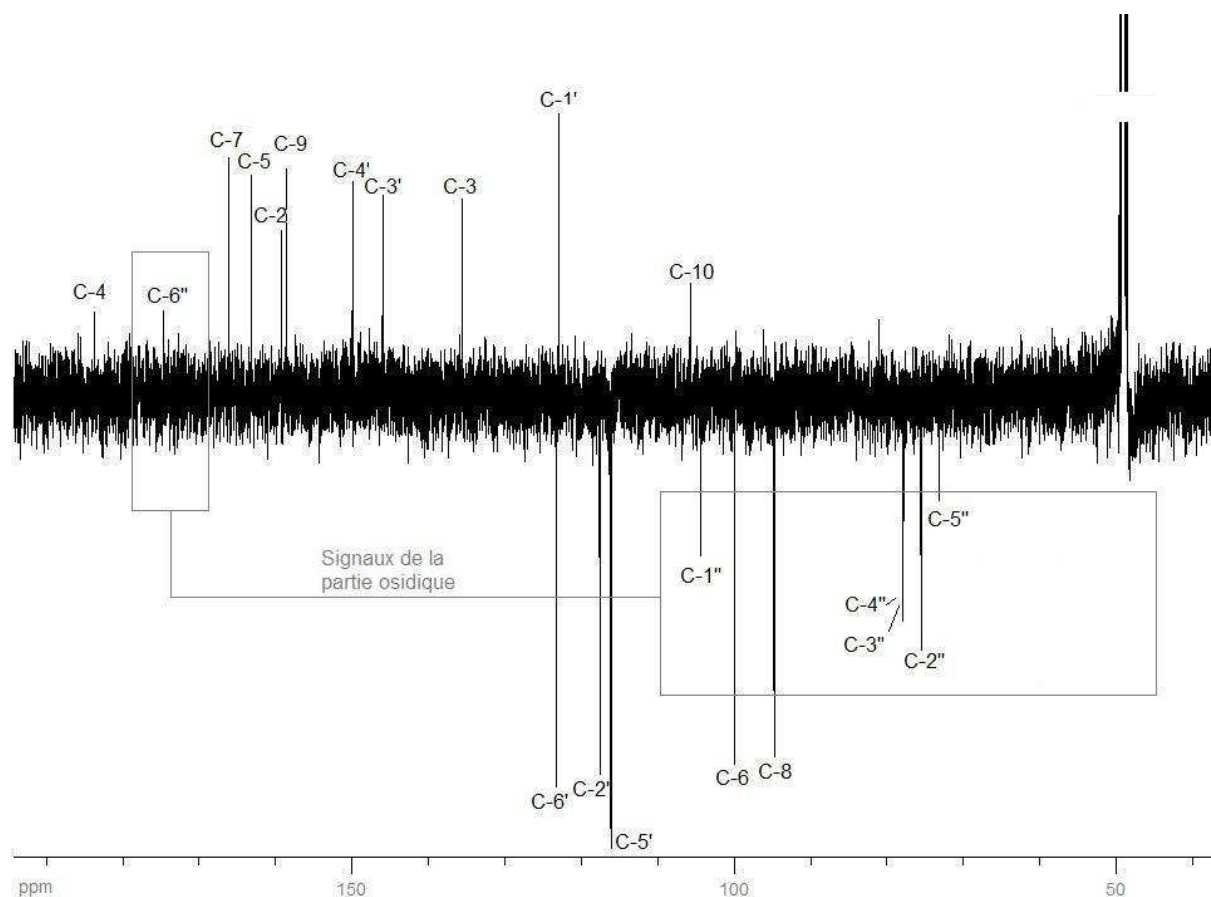


Figure III 23. Spectre RMN- $^{13}\text{C}$  du composé **D** dans MeOD.

Le couplage sur le spectre HMBC entre le proton anomérique H-1'' et le C-3 de la génine indique que celui-ci porte l'acide glucuronique. Par ailleurs, la constante de couplage du proton anomérique  $J = 7.4 \text{ Hz}$  indique une configuration  $\beta$  de la liaison osidique.

La comparaison des données spectrales du composé **D** avec celles de la littérature confirme l'identité de celui-ci comme étant la quercétine-3- $O$ - $\beta$ -glucuronopyranoside [Parejo *et al.*, 2004].

Ce composé, également appelé miquélianine, a été isolé pour la première fois d'une Ericaceae : *Gaultheria miqueliana* et est commun dans cette famille.

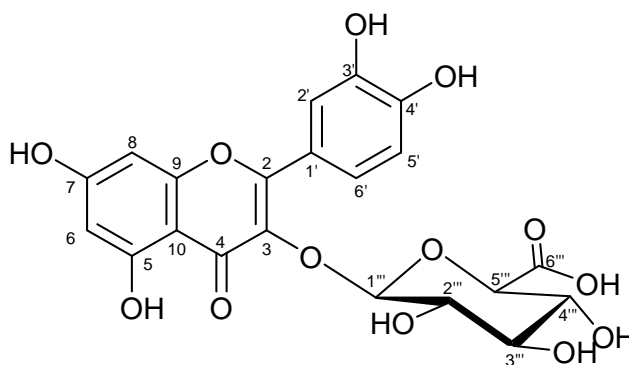


Figure III 24. Structure de la quercétine-3- $O$ - $\beta$ -glucuronopyranoside (composé **D**).

## 2.4. Comparaison des fractions flavonoïdiques de *Agauria salicifolia* et de *Agauria polyphylla* par LC-MS

*Agauria salicifolia* et *Agauria polyphylla* sont deux espèces morphologiquement très proches au point que certains auteurs refusent à *APY* le statut d'espèce ; il ne s'agirait que d'une forme adaptée à la sécheresse de l'espèce *ASA* (cf. chapitre II). Or le criblage biologique de Serdex a montré que ces deux plantes présentaient des activités biologiques différentes. Dans l'optique d'un développement commercial de l'extrait d'*APY*, il s'est donc avéré nécessaire de développer une technique d'identification complémentaire à la botanique permettant de distinguer chimiquement les deux espèces.

Nous avons donc choisi de comparer les fractions flavonoïdiques des extraits  $F_1$  de *ASA* et *APY* par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS).

### 2.4.1. Obtention des fractions flavonoïdiques : mise au point d'une méthode de séparation des tanins condensés (proanthocyanidols) par précipitation

Afin de faciliter l'étude des flavonoïdes par LC-MS, il était nécessaire d'obtenir une fraction enrichie en composés flavonoïdiques. Les essais préliminaires menés pour les fractionnements de *APY*  $F_3$  et *ASA*  $F_1$  ont montré que par les techniques chromatographiques classiques sur colonnes (exclusion et/ou adsorption), il n'est pas possible de concentrer les flavonoïdes dans une fraction sans, dans le même temps, enrichir considérablement cette fraction en proanthocyanidols. Nous avons donc mis au point une technique permettant d'éliminer les proanthocyanidols des extraits éthanoliques basés sur la propriété qu'ont les tanins d'être solubles dans méthanol et insolubles dans le chloroforme.

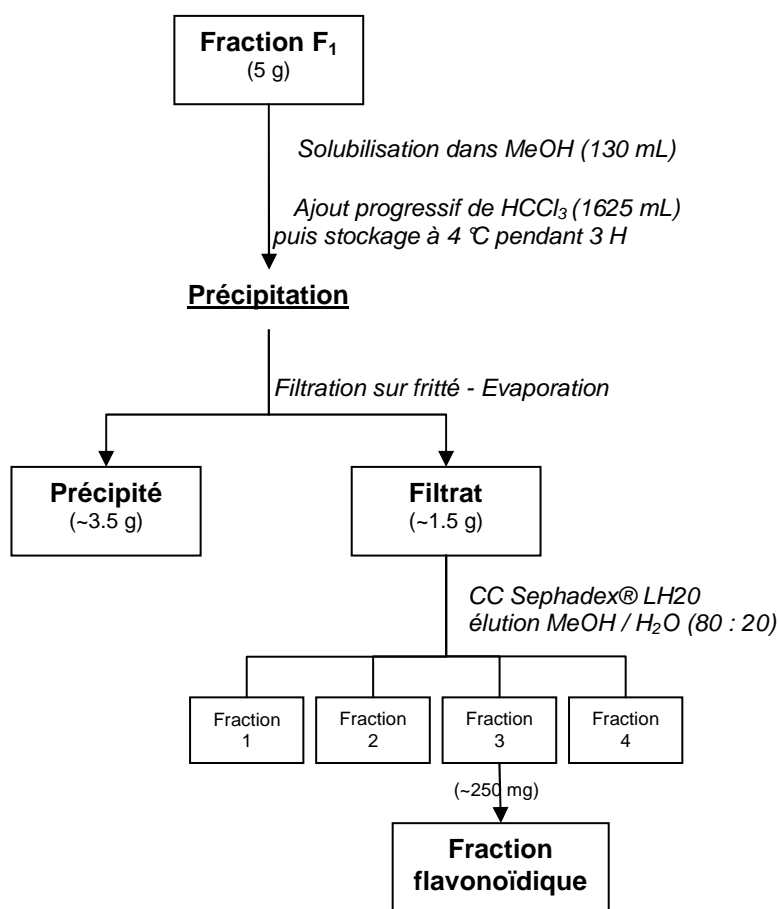
Cette méthode simple, rapide et reproductible est destinée à éliminer le maximum des tanins des fractions éthanoliques de *ASA* et *APY*, en particulier les tanins les plus polaires, c'est-à-dire de haut degré de polymérisation. Ces derniers sont les plus difficiles à séparer des flavonoïdes par les méthodes chromatographiques classiques. Le mode opératoire de cette méthode est présenté figure III 26. Il est à noter que des techniques reposant sur les mêmes propriétés de solubilité des proanthocyanidols sont employées pour séparer les tanins du vin en fonction de leur degré de polymérisation [Saucier *et al.*, 2001].

**Élimination des proanthocyanidols par précipitation :** Dissoudre l'extrait dans du MeOH (8 mL de MeOH pour 300 mg d'extrait). Ajouter une quantité suffisante de  $\text{HCCl}_3$  pour obtenir une solution à 8 % de MeOH dans le  $\text{HCCl}_3$ . On observe immédiatement une précipitation des tanins. Mettre le mélange à 4 °C pendant plusieurs heures. Filtrer et évaporer le filtrat.

Figure III 25. Mode opératoire de la méthode d'élimination des proanthocyanidols par précipitation.

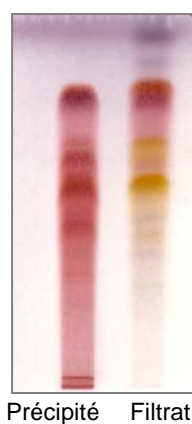
Contrairement à d'autres techniques (la chromatographie d'exclusion sur gel de Sephadex® par exemple), cette technique peut facilement être mise en œuvre sur d'importantes quantités d'extrait (jusqu'à plusieurs grammes). Plus on augmente la proportion de chloroforme plus on précipite les tanins de faibles degrés de polymérisations. Nous avons établi que la valeur limite dans notre cas est de 8 % de  $\text{HCCl}_3$ , au-delà de cette valeur, les flavonoïdes de l'extrait commencent à précipiter également.

Cette méthode a été mise en œuvre pour les fractions F1 de *Agauria salicifolia* et *Agauria polyphylla* (respectivement **ASA F<sub>1</sub>** et **APY F<sub>1</sub>**) (figure III 27).



**Figure III 26. Schéma d'obtention des fractions flavonoïdiques de ASA et APY**

Comme cela est visible sur la CCM présentant les deux fractions obtenues après précipitation (figure III 28), le filtrat ainsi obtenu contient donc encore les proanthocyanidols les plus apolaires (mono et/ou oligomères). Un fractionnement sur gel de Sephadex® élué au MeOH / H<sub>2</sub>O (8 : 2) est donc nécessaire pour éliminer ces composés (figure III 27).



**Figure III 27. CCM des deux fractions obtenues après la précipitation des tanins sur APY F<sub>1</sub> (élution : AcOEt / MeOH / H<sub>2</sub>O (100 : 13.5 : 10) ; révélation : réactif à la vanilline sulfurique).**

### 2.4.2. LC-MS comparée des fractions flavonoïdiques de ASA et APY

Pour l'analyse en LC-UV(DAD)-ESIMS en mode négatif des fractions flavonoïdiques de ASA et APY, les échantillons à analyser ont été solubilisés dans un mélange de MeOH et H<sub>2</sub>O à parts égales puis injectés dans un système HPLC dont les paramètres expérimentaux sont décrits au chapitre IV.

Nous avons également étudié le comportement de témoins dans les mêmes conditions. Nous disposons de quatre témoins commerciaux : quercétine, kaempférol, quercétine-3-*O*-galactoside (hypéroside), quercétine-3-*O*-glucoside (isoquercitrine) et de trois témoins obtenus au laboratoire : kaempférol-3-*O*-arabinofuranoside, kaempférol-3-*O*-arabinopyranoside et kaempférol-3-*O*-rhamnoside.

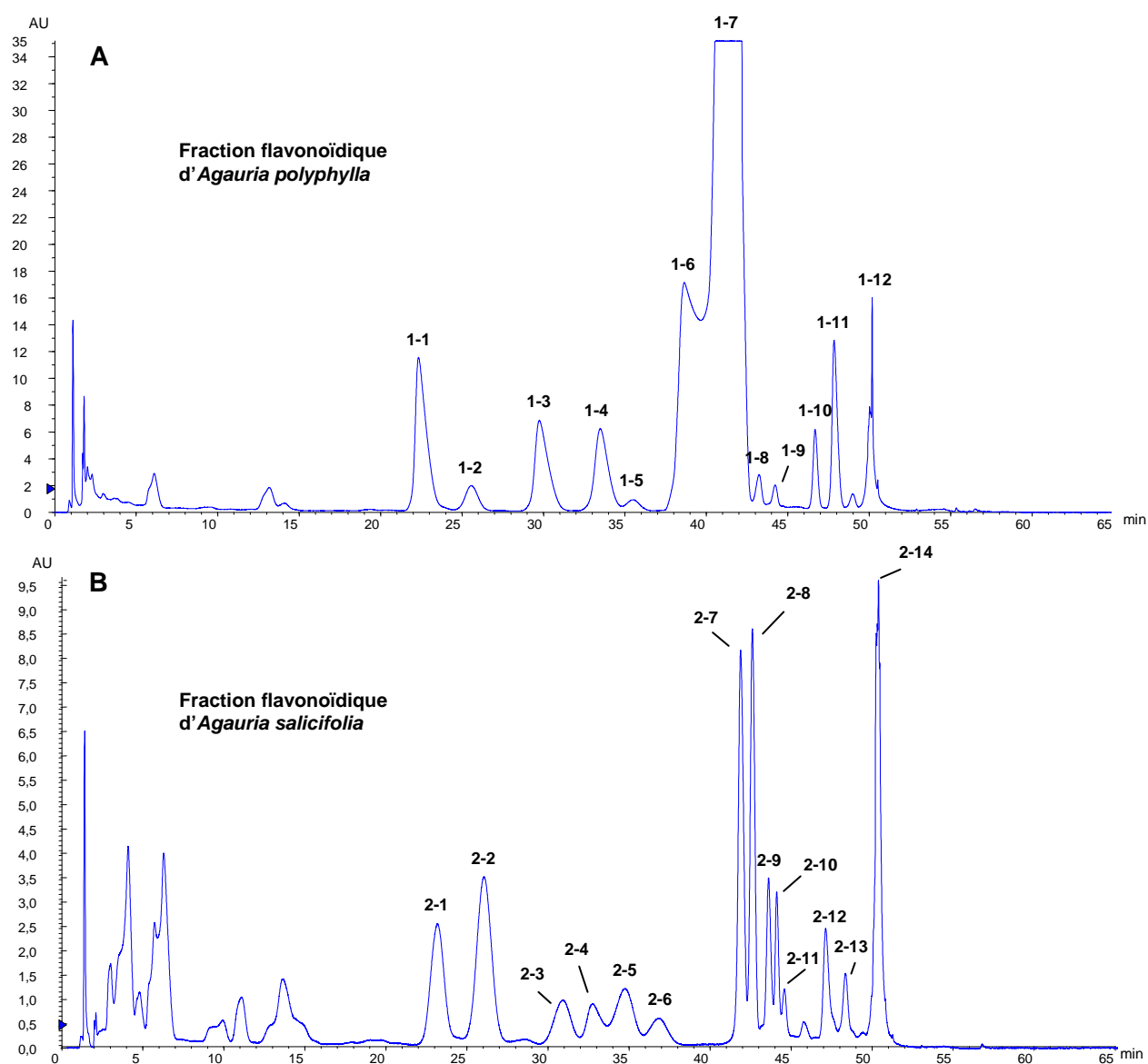
Les résultats de cette étude ont donné lieu à la rédaction d'une publication présentée en annexe.

#### 2.4.2.1. Profil HPLC des deux fractions flavonoïdiques.

Les chromatogrammes HPLC des extraits flavonoïdiques de *Agauria salicifolia* et *Agauria polyphylla* sont présentés figure III 29.

A l'instar des conclusions apportées par les CCM préliminaires, les profils HPLC à 260 nm des deux plantes sont similaires mais pas totalement identiques. En effet, douze pics sont détectés aux mêmes temps de rétention dans les deux extraits. Ces pics ont cependant des aires très différentes d'un extrait à l'autre. En outre, deux pics (correspondant aux composés **2-4** et **2-10**) ne sont présents que dans l'extrait d'ASA (figure III 29 B).

L'étude des spectres UV des pics **1-1** à **1-1** pour APY et **2-1** à **2-14** pour ASA ont montré que tous ces composés présentent les caractéristiques des flavones : une bande d'absorption à 254-262 nm, une autre à 341-360 nm et un épaulement à 290 nm (tableau III 1).



**Figure III 28. Chromatogrammes HPLC-UV(DAD) des fractions flavonoïdiques de *Agauria polyphylla* (A) et *Agauria salicifolia* (B) à 260 nm.**

#### 2.4.2.2. Identification des composés des fractions flavonoïdiques par LC-MS.

Par une première analyse LC-MS, nous avons obtenu les spectres de premier ordre des composés (analyse en « *full scan mode* ») puis nous avons procédé à des expériences MS/MS (analyses en mode « *product ion scan* »). Les témoins ont également été analysés en LC-MS afin de comparer leurs caractéristiques, à savoir ; temps de rétention ( $t_R$ ), spectre UV et fragmentation en masse, à celles des composants des deux extraits.

Le tableau III 1 présente les données obtenues à l'issue des analyses LC-MS et LC-MS/MS pour les composants des extraits d'ASA et APY ainsi que les temps de rétention de chaque composé.

Le type de sucre attaché dans le cas de flavonol *O*-glycosylé a été déterminé par la perte d'un fragment correspondant à un hexose ou un pentose (respectivement -162 u, -132 u) à partir de l'ion *quasi*-



moléculaire  $[M-H]^-$ . Pour les pertes de 146 u et 176 u, correspondant respectivement à un désoxyhexose et à un acide uronique, nous admettrons, comme dans la littérature, qu'il s'agit des pertes respectives d'un rhamnose et d'un acide glucuronique [Cuyckens *et al.*, 2002 ; Cuyckens et Claeys, 2004].

Pour la majorité des composés, les ions fragments présents sur le spectre de premier ordre nous ont permis d'identifier la génine. Pour tous les pics, la présence de l'ion radical génine  $Y_0^{\bullet-}$ , en plus de l'ion de la génine  $Y_0^-$ , indique une double liaison entre les positions 2 et 3 du cycle C de la génine confirmant la présence de flavonols. Il a été décrit par Petsalo *et al.* que dans le cas de l'utilisation d'un spectromètre de masse à triple quadripôle (comme c'est le cas ici), la formation d'un ion radical  $Y_0^{\bullet-}$  intense est due au clivage homolytique d'une liaison osidique en position 3 (ce radical est faible ou absent dans le cas d'une glycosylation en 7) [Petsalo *et al.*, 2006]. Comme tous les spectres de masse des composés **1-1** à **1-11** et **2-1** à **2-13** présentaient un ion radicalaire intense pour la génine, nous pouvons supposer que la liaison osidique se trouve en position 3 comme c'est le cas pour les flavonols glycosylés que nous avons isolés de *Agauria salicifolia* et *Agauria polyphylla* (cf. paragraphes 2.2.3.1 et 2.3.2).

Les ions résultant de la fragmentation de la génine (soit présents sur le spectre de premier ordre, soit obtenus par fragmentation de  $Y_0^-$  par pseudo  $MS^3$  quand  $Y_0^-$  est présent sur le spectre de premier ordre) nous ont permis d'identifier les génines des composés par comparaison avec la fragmentation des témoins. En effet, deux génines ont pu être identifiées :

- la quercétine, pour les composés **1-1** à **1-7**, **1-12**, **2-1** à **2-8** et **2-14**, avec les fragments caractéristiques :  $Y_0^-$  à  $m/z$  301,  $[Y_0-H]^{\bullet-}$  à  $m/z$  300,  $^{1,3}A^-$  à  $m/z$  151 et  $^{1,2}A^-$  à  $m/z$  179 ainsi que  $[Y_0-CH_2O]^-$  à  $m/z$  271 et  $[Y_0-H_2O-CO]^-$  à  $m/z$  255 ;
- le kaempférol, pour les composés **1-8** à **1-11** et **2-9** à **2-13**, avec les fragments caractéristiques  $Y_0^-$  à  $m/z$  285,  $[Y_0-H]^{\bullet-}$  à  $m/z$  284 ainsi que  $[Y_0-CH_2O]^-$  à  $m/z$  255 et  $[Y_0-CH_2O-CO]^-$  à  $m/z$  227.

Les spectres de masse des composés **1-1** et **2-1**, d'une part, et **1-2** et **2-2**, d'autre part, présentent la perte de 162 u correspondant à un hexose. Ils ont été identifiés comme étant la quercétine-3-*O*-galactoside ou hypéroside (**1-1** et **2-1**) et la quercétine-3-*O*-glucoside ou isoquercitrine (**1-2** et **2-2**) par comparaison de leurs temps de rétention respectifs avec ceux des substances de référence.

La perte du fragment de 146 u, caractéristique d'un rhamnose, sur les spectres des composés **1-7** et **2-8**, d'une part, et, **1-11** et **2-13**, d'autre part, nous a permis d'identifier ces couples de composés comme étant respectivement la quercétine-3-*O*-rhamnoside ou quercitroside et le kaempférol-3-*O*-rhamnoside.

Tableau III 1. Flavonoïdes identifiés dans les fractions flavonoïdiques de *Agauria salicifolia* et *Agauria polyphylla* par LC-ESI-MS/MS en mode négatif.

Composé	Pic	t <sub>R</sub> (min)	UV λ <sub>max</sub> nm	Masse molaire	Ions présents sur le spectre de		Masse du sucré	Fragment Y <sub>0</sub> <sup>-</sup>	Analyse MS/MS ions fragments de Y <sub>0</sub> <sup>-b</sup>
					[M-H] <sup>-</sup>	premier ordre Fragments <sup>a</sup>			
<b>Agauria polyphylla</b>									
Quercétine-3-O-galactoside	1-1	22.3	254, 346	464	463	300, 271, 255, 301	162	301	-
Quercétine-3-O-glucoside	1-2	25.5	253, 349	464	463	300, 301	162	301	151, 273, 257, 179
Quercétine-3-O-pentose	1-3	29.7	254, 349	434	433	271, 255, 300, 301	132	301	-
Quercétine-3-O-pentose	1-4	33.5	254, 346	434	433	271, 300, 301, 255	132	301	-
Quercétine-3-O-pentose	1-5	35.2	254, 346	434	433	301	132	301	151, 179, 257, 273
Quercétine-3-O-arabinofuranoside	1-6	38.6	254, 346	434	433	271, 300, 301, 255, 179, 151	132	301	-
Quercétine-3-O-rhamnoside	1-7	41.4	254, 346	448	447	300, 271, 301, 255, 151	146	301	-
Kaempférol-3-O-arabinopyranoside	1-8	43.2	262, 341	418	417	227, 255, 284, 285	132	285	-
Kaempférol-3-O-pentose	1-9	44.1	262, 341	418	417	227, 284, 255, 285	132	285	-
Kaempférol-3-O-arabinofuranoside	1-10	46.7	262, 341	418	417	284, 255, 227, 285	132	285	-
Kaempférol-3-O-rhamnoside	1-11	47.8	262, 341	432	431	284, 285, 255, 227	146	285	-
Quercétine	1-12	50.2	245, 360	302	301	271, 255, 151	-	301	151, 179
<b>Agauria salicifolia</b>									
Quercétine-3-O-galactoside	2-1	22.8	254, 346	464	463	300, 301, 271, 255	162	301	-
Quercétine-3-O-glucoside	2-2	25.7	253, 349	464	463	271, 300, 301	162	301	-
Quercétine-3-O-pentose	2-3	30.1	254, 349	434	433	300, 301	132	301	151, 179, 273, 229
Quercétine-3-O-glucuronide	2-4	32.8	254, 346	478	477	301	176	301	151, 179, 229, 273
Quercétine-3-O-pentose	2-5	34.5	254, 346	434	433	301, 300	132	301	151, 179, 273, 229
Quercétine-3-O-pentose	2-6	36.5	254, 346	434	433	300, 301	132	301	151, 257, 179, 273
Quercétine-3-O-arabinofuranoside	2-7	41.7	254, 346	434	433	300, 301, 271, 255	132	301	-
Quercétine-3-O-rhamnoside	2-8	42.3	254, 346	448	447	271, 300, 301, 255	146	301	-
Kaempférol-3-O-arabinopyranoside	2-9	43.3	262, 341	418	417	227, 255, 284, 285	132	285	-
Kaempférol-3-O-glucuronide	2-10	43.9	262, 341	462	461	285	176	285	285, 229, 257, 151
Kaempférol-3-O-pentose	2-11	44.2	262, 341	418	417	285, 284	132	285	257, 229
Kaempférol-3-O-arabinofuranoside	2-12	46.8	262, 341	418	417	255, 284, 285, 227	132	285	-
Kaempférol-3-O-rhamnoside	2-13	47.0	262, 341	432	431	285, 284, 255, 227	146	285	-
Quercétine	2-14	50.1	245, 360	302	301	271, 255, 151	-	301	151, 179

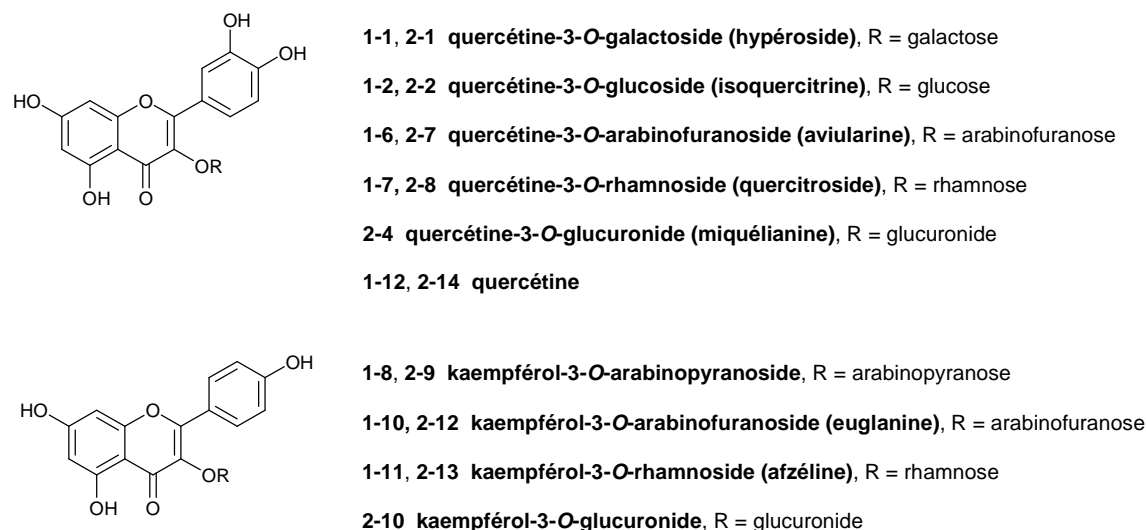
<sup>a</sup> Listés par ordre d'abondance. <sup>b</sup> Expérience de "pseudo MS<sup>2</sup>" sur l'ion Y<sub>0</sub><sup>-</sup> (généré dans la source).

<sup>a</sup> Listés par ordre d'abondance. <sup>b</sup> Expérience de "pseudo MS<sup>3m</sup>" sur l'ion  $Y_0^-$  (généralisé dans la source).

Les composés **1-8** et **2-9**, **1-9** et **2-11**, **1-10** et **2-12** montrent la fragmentation caractéristique des kaempférol-3-*O*-pentose (ion *quasi*-moléculaire à  $m/z$  417, perte d'un fragment à 132 u et ion  $Y_0$  à  $m/z$  285). La comparaison des temps de rétention de ces composés avec ceux des kaempférol-3-*O*-pentose témoins a permis d'identifier **1-8** et **2-9** comme étant le kaempférol-3-*O*-arabinopyranoside et **1-10** et **2-12** comme étant le kaempférol-3-*O*-arabinofuranoside ou euglanine.

Les données LC-MS des composés **1-3**, **1-4**, **1-5**, **1-6** et **2-3**, **2-5**, **2-6**, **2-7** ont apporté les preuves de la présence d'isomères de quercétine-3-*O*-pentose (ion *quasi*-moléculaire à  $m/z$  433, perte d'un fragment à 132 u et ion  $Y_0$  à  $m/z$  301) mais n'ont pas permis de les différencier. Nous avons mesuré le temps de rétention du composé **B** (précédemment isolé de *APY* et identifié comme étant la quercétine-3-*O*-arabinofuranoside) dans ces conditions analytiques. Ce temps de rétention correspond à celui des composés **1-6** et **2-7** qui ont donc été identifiés comme étant la quercétine-3-*O*-arabinofuranoside ou avicularine.

Nous l'avons vu précédemment, les profils flavonoïdiques de *ASA* et *APY* diffèrent par la présence des composés **2-4** et **2-10** sur le profil de *ASA*. Ces composés ont été identifiés par la perte du fragment à 176 u et par la fragmentation de leurs génines comme étant respectivement la quercétine-3-*O*-glucuronide et le kaempférol-3-*O*-glucuronide. La coïncidence des temps de rétention de **2-4** et du composé **D** isolé de *ASA* a permis de confirmer les données obtenues par la spectrométrie de masse : le composé **2-4** est la miquélianine.



**Figure III 29.** Structures des composés identifiés de *Agauria salicifolia* et *Agauria polyphylla* par LC-ESI-MS.

### 2.4.3. Conclusion

La comparaison par LC-MS des extraits flavonoïdiques de *Agauria salicifolia* et *Agauria polyphylla* a révélé que ces deux extraits avaient des profils similaires où prédominaient la quercétine-3-*O*-arabinofuranoside et la quercétine-3-*O*-rhamnoside. Les douze flavonoïdes communs aux deux plantes constituent un ensemble caractéristique pouvant constituer des marqueurs de qualité pour ces plantes. Les différences entre les deux fractions flavonoïdiques reposent sur les concentrations des composés et surtout sur la présence de deux flavonols à substituants acide glucuronique dans ASA uniquement.

### 2.5. Conclusions de l'étude phytochimique de *Agauria salicifolia* et *Agauria polyphylla*

L'étude des extraits éthanoliques de *Agauria salicifolia* et *Agauria polyphylla* nous a permis de renforcer la connaissance phytochimique de ces deux plantes. Trois molécules ont été isolées de *Agauria polyphylla* : l'avicularine (**A**), la (-)-épicatéchine (**B**) et le lupéol (**C**). La miquélianine (**D**) a été isolée de *Agauria salicifolia*.

La comparaison par LC-MS des extraits flavonoïdiques de *Agauria salicifolia* et *Agauria polyphylla* nous a permis d'identifier onze flavonoïdes supplémentaires sans les isoler (figure III 30) et de montrer qu'il existe des différences phytochimiques entre les deux plantes.

Ces résultats sont en accord avec le point de vue de botanistes comme Boiteau qui sont en faveur de l'existence distincte de l'espèce *Agauria polyphylla* (et non comme étant un polymorphisme de *Agauria salicifolia*) [Boiteau *et al.*, 1959]. Ainsi, nos résultats montrent, comme cela avait été démontré pour d'autres espèces végétales, que les flavonoïdes peuvent être utilisés comme critères de différenciation taxonomique [Lauranson *et al.*, 1995 ; Kawashty et El-Garf, 2000]. Cependant, un complément d'études botaniques serait nécessaire pour trancher définitivement quant au statut d'espèce de *Agauria polyphylla*.

Cette étude par LC-MS serait à reconduire sur plusieurs lots de feuilles de *Agauria salicifolia* et de *Agauria polyphylla* pour éprouver la spécificité de ces traceurs de différenciation.

Si la distinction chimique était reproductible sur plusieurs lots, nous aurions alors à notre disposition une méthode analytique simple et rapide à mettre en place :

- soit par analyse HPLC en détectant la présence ou l'absence de la miquélianine pour savoir à quelle espèce appartient l'échantillon analysé ;

- soit directement par MS en introduction directe et détection (dans un spectromètre type triple quadripôle par exemple) de la perte de neutre de -176 u (perte d'un acide uronique spécifique des flavonoïdes de *Agauria salicifolia*).

### 3. Etude phytochimique des feuilles de *Tambourissa trichophylla* (TTI)

La plante *Tambourissa trichophylla* Baker a été choisie pour son utilisation traditionnelle à Madagascar en tant que cicatrisant et dans les affections de la bouche. Suite au criblage pharmacologique mené par Serdex, l'extrait **F<sub>3</sub>** de TTI a été choisi pour subir une étude phytochimique approfondie.

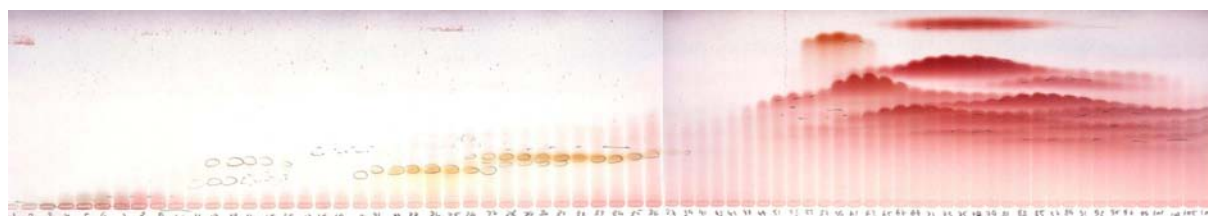
#### 3.1. Fractionnement de l'extrait TTI/F<sub>3</sub> et isolement des composés E, F et G

L'objectif de ce travail sur l'extrait TTI F<sub>3</sub> était d'isoler les flavonoïdes majoritaires observés lors du screening préliminaire par CCM. Or, ceux-ci sont plus polaires que ceux de APY et ASA et se situent dans la même zone de polarité que la majorité des tanins de l'extrait. Dans un premier temps, nous avons testé les techniques mises en œuvre pour ASA et APY (chromatographie d'exclusion sur Sephadex® ou chromatographie d'adsorption sur silice en phase normale ou inverse) pour purifier les flavonoïdes de TTI mais ces méthodes se sont avérées inefficaces.

Nous avons donc choisi de séparer les molécules par chromatographie de partage centrifuge (CPC) (figure III 32). Cette technique permet de séparer les constituants d'un mélange entre deux phases liquides non miscibles en fonction de leur coefficient de partage (*cf.* chapitre IV).

Le système de solvant utilisé est un système décrit dans la littérature pour l'isolement de flavonoïdes : AcOEt / EtOH / H<sub>2</sub>O dans les proportions 2 : 1 : 2. Les conditions opératoires sont décrites au chapitre IV. La phase supérieure de ce mélange est utilisée comme phase éluante et la phase inférieure, comme phase stationnaire [Marston *et al.*, 1990a, b].

Le suivi par CCM de ce fractionnement, présenté à la figure III 31, a permis de rassembler 8 fractions (figure III 31). L'essentiel de la masse de l'extrait TTI F<sub>3</sub> est concentré dans les fractions F3.6 à F3.9 qui contiennent les tanins de haut poids moléculaire (les plus polaires et les plus polymérisés).



**Figure III 30.** CCM du suivi de fractionnement de l'extrait TTI F<sub>3</sub> par CPC (élution : AcOEt / MeOH / H<sub>2</sub>O (100 : 13.5 : 10) ; révélation : réactif à la vanilline sulfurique).

Les fractions F3.4 et F3.5 ont ensuite été purifiées sur chromatographies en phase inverse C18 sur cartouches, associées à une unité de filtration Vac Elut®, éluées avec un gradient MeOH / H<sub>2</sub>O pour donner respectivement les composés **E** et **F**.

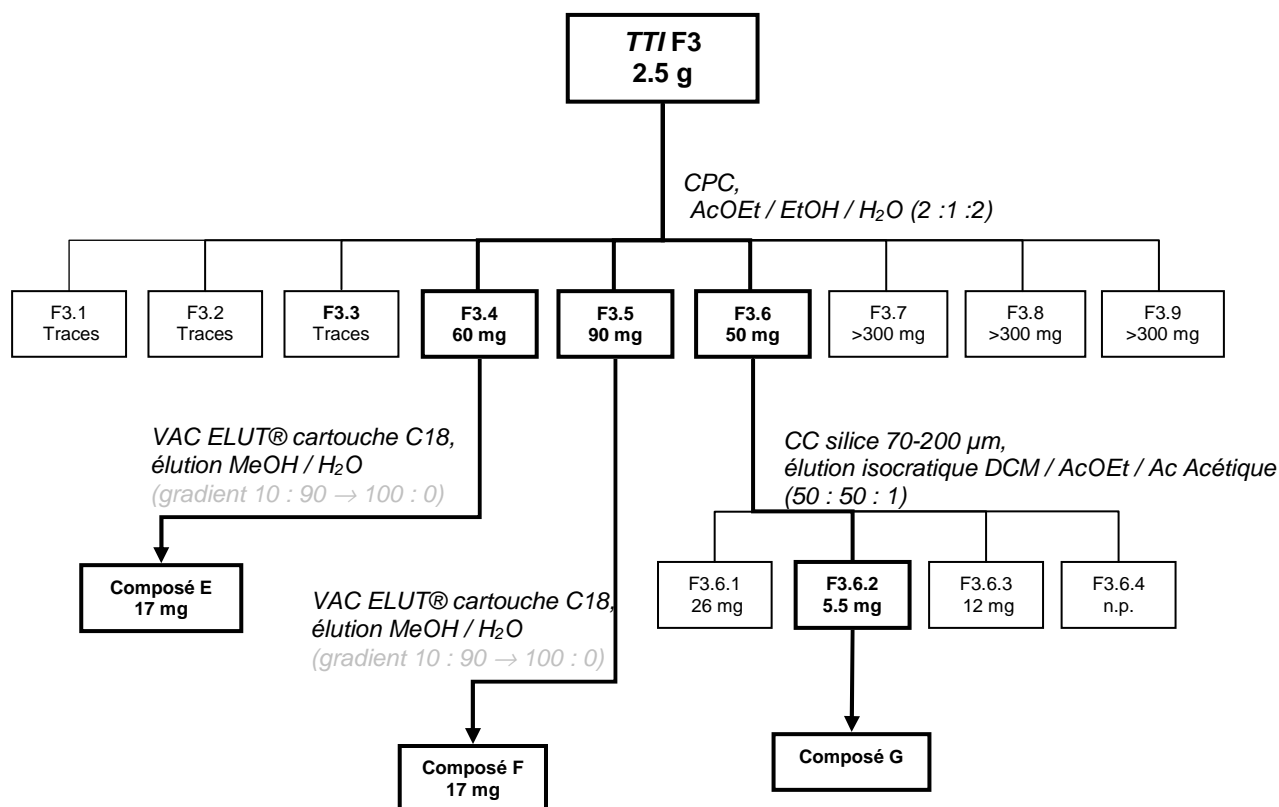


Figure III 31. Schéma de fractionnement de l'extrait *TTI* F3.

La fraction F3.6 contenait les molécules les plus apolaires, vraisemblablement monomères et/ou oligomères. Cette fraction a été soumise à un fractionnement par chromatographie d'adsorption sur silice élue par DCM / AcOEt / H<sub>2</sub>O (50 : 50 : 1) pour donner le composé **G**.

### 3.1.1. Détermination de structures des composés E, F et G de *Tambourissa trichophylla*

#### 3.1.1.1. Détermination de structure du composé E

Le composé **E** se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Ce composé réagit avec le réactif de Neu en affichant une fluorescence jaune sous UV à 365 nm laissant envisager une structure de type flavonoïde confirmée par les deux maxima à 258 et 352 nm du spectre d'absorption UV, caractéristiques des bandes I et II d'un flavonol.

#### Spectrométrie de masse.

Le spectre en ESI<sup>-</sup> montre un ion *quasi*-moléculaire [M-H]<sup>-</sup> à  $m/z$  609 suggérant une masse atomique de 610 u (figure III 33).

Le spectre en ESI<sup>+</sup> (figure III 34) confirme la masse atomique car il présente les ions [M+Na]<sup>+</sup> ( $m/z$  633) et [M+K]<sup>+</sup> ( $m/z$  649). Sur le spectre MS/MS de l'ion [M+Na]<sup>+</sup>, nous observons les ions

fragments à  $m/z$  487  $[M+H-146+Na]^+$  indiquant la perte d'un désoxyhexose et 325  $[M+H-146-162+Na]^+$  et 324  $[M+H-146-162+Na]^+$  indiquant la perte additionnelle d'un hexose. Il est à noter que, de façon inattendue, l'ion du fragment osidique  $[146+162+Na]^+$  est visible sur ce spectre et constitue le pic de base (figure III 34). La fragmentation MS/MS de l'ion  $[M-H]^-$  engendre les pics d'ions fragments à  $m/z$  300 et 301 (respectivement  $Y_0^-$  et  $Y_0^-$  dans un ratio d'environ 250 %), 271, 255, 179 ( $^{1,2}A^-$ ) et 151 ( $^{1,3}A^-$ ), comparables aux fragments des composés **A** et **D**. Tous ces éléments laissent supposer pour **E** une structure de type quercétine-3-*O*-diglycoside et la formule brute  $C_{27}H_{30}O_{16}$ .

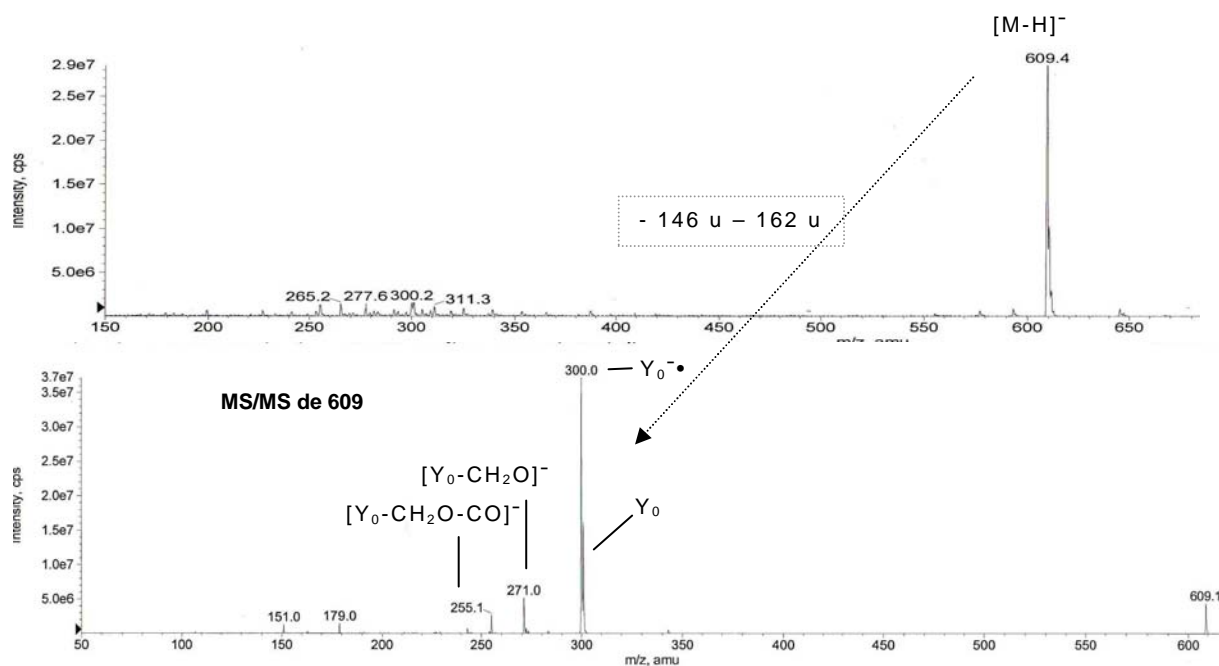


Figure III 32. Spectres de masse ESI<sup>-</sup> du composé E (MeOH)

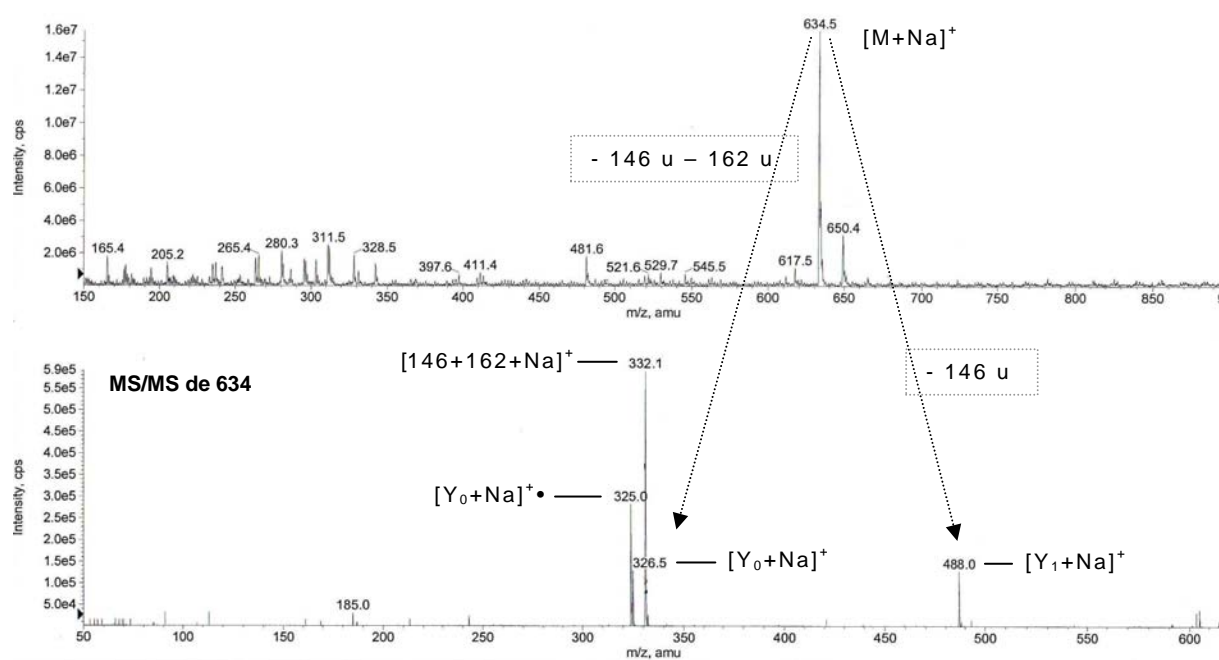


Figure III 33. Spectres de masse ESI<sup>+</sup> du composé E (MeOH)



### Spectrométrie de RMN.

Les signaux présents sur le spectre de RMN- $^1\text{H}$  du composé **E** (figure III 35) dans la région de protons aromatiques renforcent l'hypothèse de la présence d'une génine de type quercétine. En outre, nous observons les signaux de deux protons anomériques à  $\delta_{\text{H}}$  5.34 ( $d$ ,  $J = 7.4$  Hz) et 4.38 ( $d$ ,  $J = 1.3$  Hz) confirmant la présence de deux sucres.

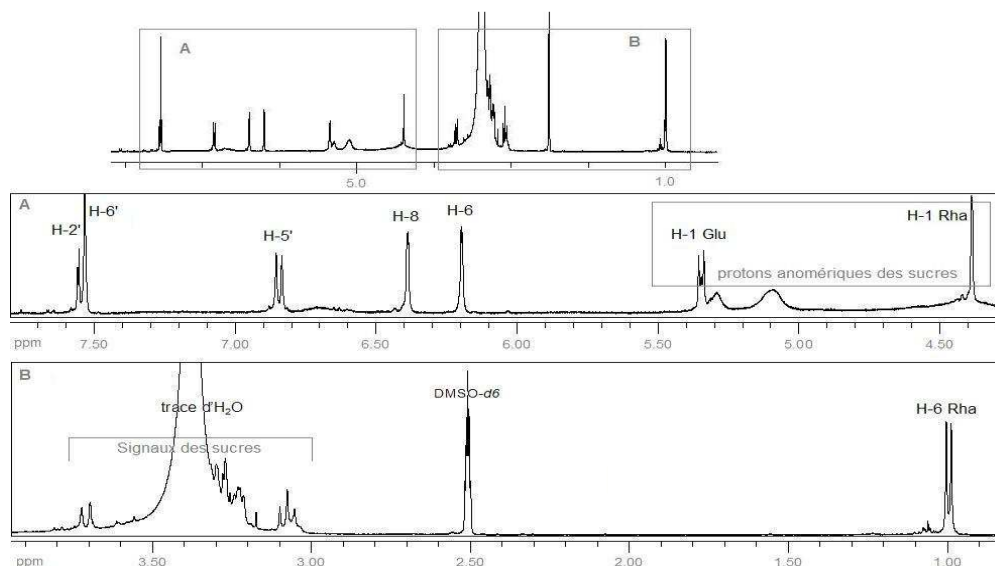


Figure III 34. Spectre de RMN- $^1\text{H}$  du composé **E** dans  $\text{DMSO}-d_6$ .

L'analyse du spectre RMN- $^{13}\text{C}$  montre les signaux caractéristiques de la génine quercétine : signal à  $\delta_{\text{C}}$  178.0 ppm du groupement carbonyle, neuf carbones quaternaires (huit entre 130 et 170 ppm et un à  $\delta_{\text{C}}$  104.6 ppm) et cinq CH aromatiques (voir figure III 36) [Ternai et Markham, 1976].

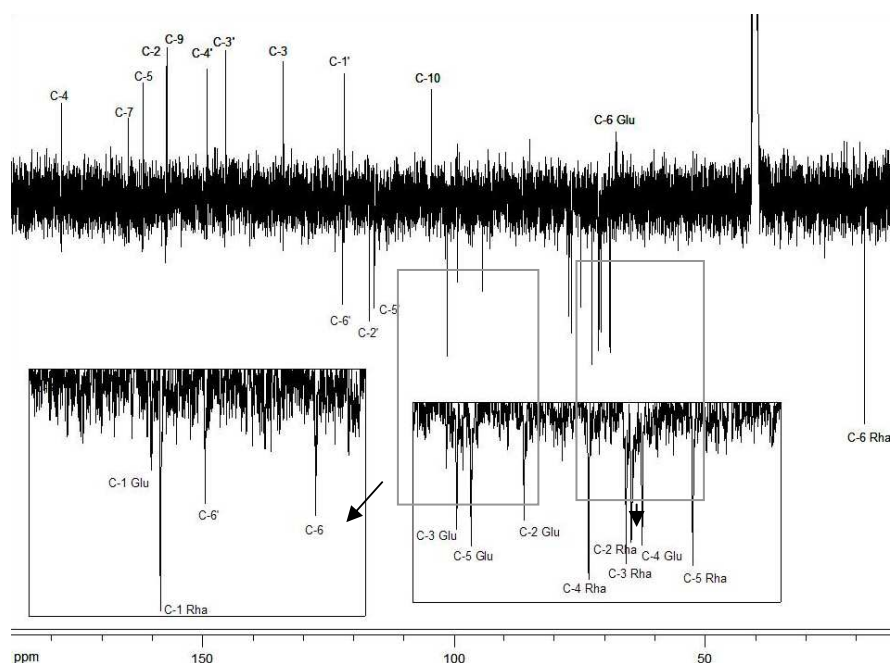
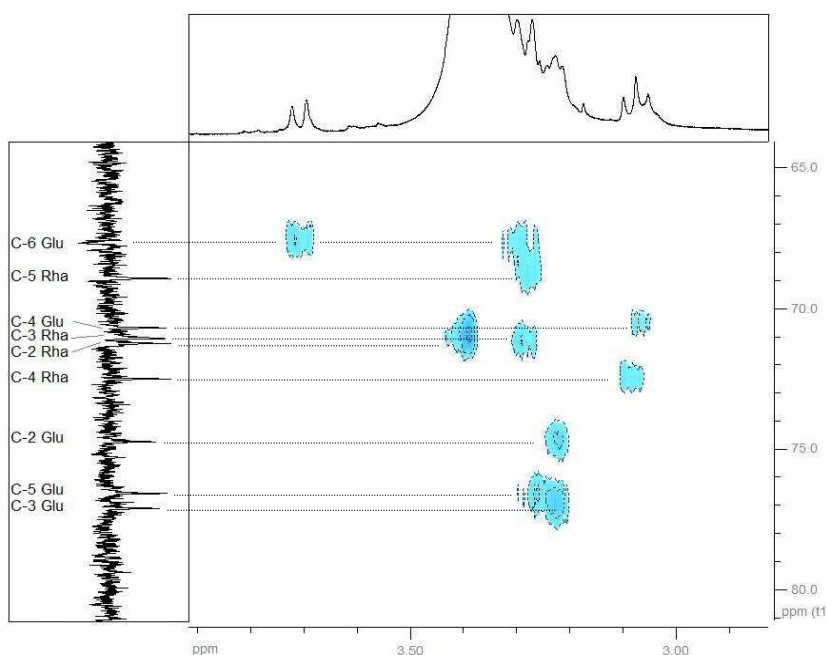


Figure III 35. Spectre de RMN- $^{13}\text{C}$  du composé **E** dans  $\text{DMSO}-d_6$ .

Parmi les signaux qui ne correspondent pas à la génine, nous observons les signaux de dix CH aliphatiques dont deux pouvant correspondre à des carbones anomériques ( $\delta_C$  101.9 et  $\delta_C$  101.4 ppm), un CH<sub>2</sub> ( $\delta_C$  67.6 ppm) et un méthyle ( $\delta_C$  18.4 ppm). Le spectre HMBC de **E** nous indique que ces carbones corrélient respectivement avec les protons anomériques à  $\delta_H$  4.38 et 5.34 ppm. Ces éléments confirment la présence de deux hexoses dans le composé **E**.

L'étude du spectre HSQC nous permet également de déduire les déplacements chimiques de protons des sucres bien que ceux-ci soient partiellement cachés par l'eau présente à 3.36 ppm dans le DMSO-*d*<sub>6</sub> (voir figure III 37).

Les déplacements RMN-<sup>13</sup>C dans la région des sucres sont caractéristiques, d'une part, d'un glucopyranose (C-2'', C-3'', C-4'', C-5'' et C-6'' respectivement à  $\delta_C$  74.7, 77.1, 70.7, 76.6 et 67.6 ppm) dont on note la configuration  $\beta$  grâce à la constante de couplage typique de son proton anomérique ( $J=7.4$  Hz) et, d'autre part, d'un rhamnopyranose (C-2''', C-3''', C-4''', C-5''' et C-6''' respectivement à  $\delta_C$  71.0, 71.2, 72.5, 68.9 et 18.4 ppm) en configuration  $\alpha$  (constante de couplage du proton anomérique H-1'''  $J = 1.3$  Hz) [Markham et Ternai, 1976 ; Senatore *et al.*, 2000].



**Figure III 36. Spectre HSQC du composé E centré sur la région des signaux des sucres dans DMSO-*d*<sub>6</sub>.**

Par ailleurs, les corrélations HMBC observées entre les protons à  $\delta_H$  4.38 ppm (H-1''') et le carbone situé à  $\delta_C$  67.6 ppm (C-6'') ont permis de montrer que les deux sucres sont liés en 1→6 et d'identifier le diglycoside comme étant du rutinose (rhamnopyranosyl-( $\alpha$ 1→6)-glucopyranoside). Le rutinose est fixé sur la génine quercétine en position 3 comme l'atteste la corrélation HMBC entre le carbone C-3 et le proton anomérique H-1''.

Le composé **E** a donc été identifié comme étant la quercétine-3-*O*- $\beta$ -rutoside, aussi appelé rutine [Rastrelli *et al.*, 1995]. Cette molécule a été identifiée pour la première fois dans *Ruta graveolens* (d'où son nom) et est présente dans plus de trente familles de plantes principalement dicotylédones. Elle est également très connue pour ses nombreuses propriétés biologiques notamment anti-œdémateuse, anti-inflammatoire, anti-thrombosiques, anti-hypotensive, spasmolytique et anti-hémorragique [DNP, 2006].

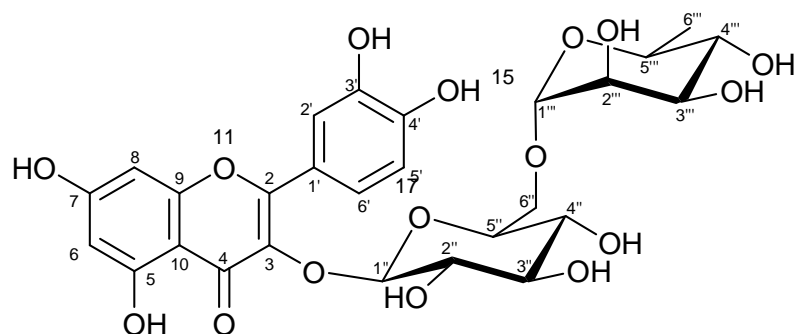


Figure III 37. Structure de la quercétine-3-*O*- $\beta$ -rutoside (composé E).

### 3.1.1.2. Détermination de structure du composé F

Le composé **F** se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Ce composé réagit avec le réactif de Neu en affichant une fluorescence verte sous UV à 365 nm laissant envisager une structure de type flavonoïde. Son spectre UV présente les bandes d'absorption caractéristiques d'un flavonol à 258 et 353 nm.

#### Spectrométrie de masse.

Nous observons la présence sur le spectre ESI<sup>-</sup> d'un ion *quasi*-moléculaire à  $m/z$  593 [M-H]<sup>-</sup> pour le composé F. Sur le spectre MS/MS de l'ion à  $m/z$  593 en ESI<sup>-</sup>, nous observons quatre ions issus de la fragmentation de l'ion [M-H]<sup>-</sup> :  $m/z$  284 Y<sub>0</sub><sup>-•</sup>,  $m/z$  285 Y<sub>0</sub><sup>-</sup>,  $m/z$  255 [Y<sub>0</sub>-CH<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> et  $m/z$  227 [Y<sub>0</sub>-CH<sub>2</sub>O-CO]<sup>-</sup> (figure III 39).

La fragmentation en ESI<sup>+</sup> de [M+Na]<sup>+</sup> de F fait apparaître les ions [Y<sub>1</sub>+Na]<sup>+</sup> à  $m/z$  472, [Y<sub>0</sub><sup>•</sup>+Na]<sup>+</sup> à  $m/z$  309 et [Y<sub>0</sub>+Na]<sup>+</sup> à  $m/z$  310 indiquant la perte successive d'un désoxyhexose (-146 u) puis d'un hexose (-146-162 u) (figure III 40).

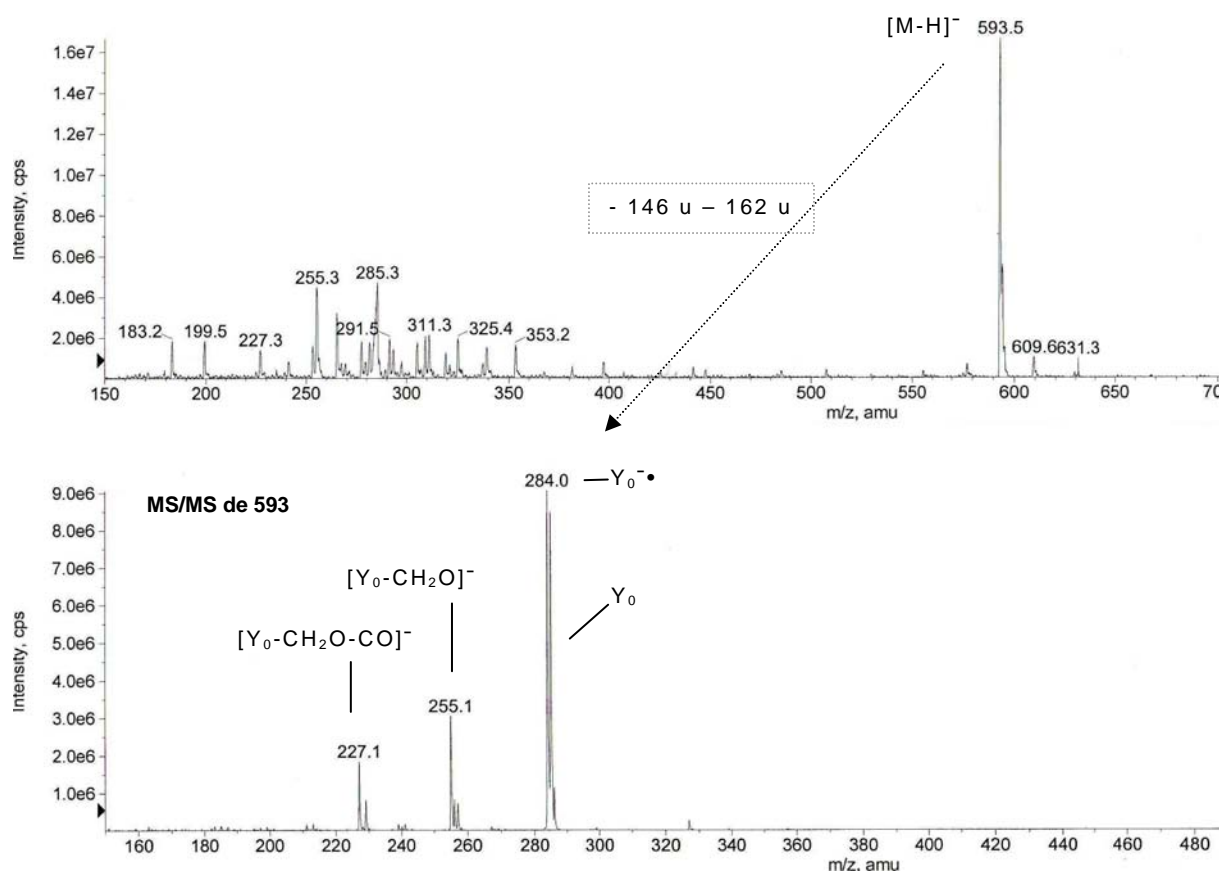


Figure III 38. Spectres de masse ESI<sup>-</sup> du composé F (MeOH)

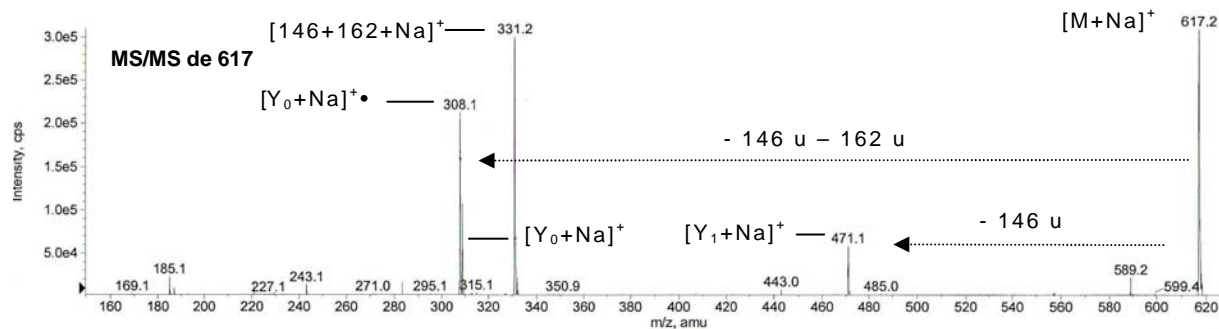


Figure III 39. MS/MS de l'ion 617 du spectre ESI<sup>+</sup> du composé F (MeOH).

### Spectrométrie de RMN.

L'étude des signaux RMN-<sup>1</sup>H de la zone correspondant aux protons de la génine a permis de mettre en évidence la présence de substituants hydroxyles en C-5 et C-7 sur le cycle A, grâce à l'identification d'un couplage *meta* des protons H-6 et H-8 du cycle A à  $\delta_H$  6.20 et 6.41 ppm.

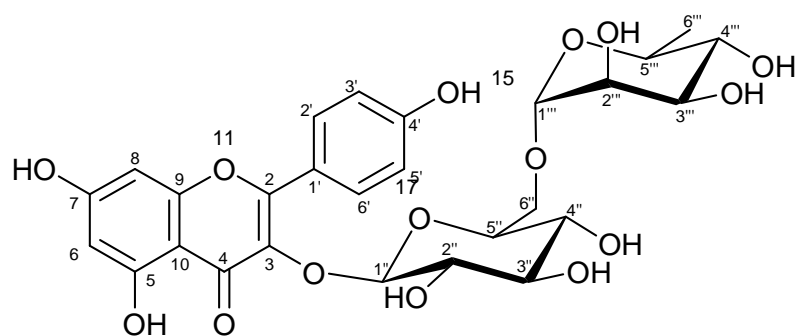
La substitution du noyau B est indiquée par la présence deux couples de doublets couplant en position *ortho* à  $\delta_H$  7.98 (d, J = 8.8 Hz) et 7.98 (d, J = 8.8 Hz) pour H-2' et H-6' et  $\delta_H$  6.88 (d, J = 8.7 Hz) et 6.88 (d, J = 8.7 Hz) pour H-3' et H-5'. Ce système 2H AA', 2H XX' sur le cycle B nous permet de placer le groupement hydroxyle en position 4' sur le cycle B. Ces données semblent confirmer les hypothèses formulées grâce à la spectrométrie quant à la présence de la génine kaempférol.

Comme pour le composé **E** (quercétine-3-*O*-rutinoside), nous observons la présence des signaux de deux protons anomériques de sucres à  $\delta_H$  5.30 et 4.38 ppm ainsi que d'autres signaux partiellement cachés par une trace d'eau.

Sur le spectre de RMN-<sup>13</sup>C du composé **F**, nous observons la présence de 27 signaux très similaires à ceux du composé **F** à l'exception de certains carbones correspondant à la génine ce qui confirme les hypothèses de la masse : les molécules **E** et **F** diffèrent par leurs génines.

Les déplacements chimiques des signaux attribuables au cycle B de la génine (différant de ceux du composé **E**) nous permettent d'indiquer la présence d'un carbone quaternaire aromatique ( $\delta_C$  121.5 ppm), d'un carbone quaternaire aromatique portant un groupement hydroxyle ( $\delta_C$  160.6 ppm) et de quatre CH aromatiques deux à deux superposés à  $\delta_C$  131.5 et 115.8 ppm. L'équivalence des signaux confirme que le groupement hydroxyle se situe en position 4'.

Nous avons comparé l'ensemble des données RMN (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, HSQC, HMBC) du composé **F** avec celles du composé **E** et celles-ci ne diffèrent qu'au niveau des signaux du cycle B. Le reste des signaux et notamment les signaux de la zone des sucres étant en tous points identiques, nous pouvons identifier le composé **F** comme étant le kaempférol-3-*O*- $\beta$ -rutinoside aussi appelé nicotiflorine.



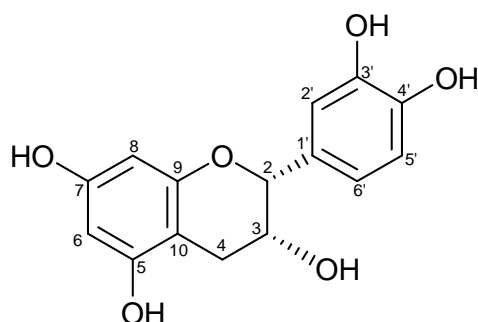
**Figure III 40. Structure du kaempférol-3-*O*- $\beta$ -rutinoside (composé F).**

La nicotiflorine est une molécule courante et a été isolée de nombreuses espèces de plantes telles que *Sophora japonica* L. [DNP, 2006] .

### 3.1.1.3. Détermination de structure du composé G

Les données analytiques du composé **G** (Rf, masse molaire et fragmentation, RMN- $^1\text{H}$  et RMN- $^{13}$  sont en tous points identiques à celles du composé **B** isolé de *APY*.

Le composé **G** est donc la (-)-épicatechine.



**Figure III 41. Structure de la (-)-épicatechine (composé G).**

Comme ce fut le cas pour les deux *Agauria*, la présence d'épicatechine dans l'extrait de *Tambourissa trichophylla* permet d'affirmer que les tanins contenus dans cette plante sont des tanins catéchiques ou proanthocyanidols.

### 3.1.2. Fractionnement du lot pilote **TTI PL002** et isolement du composé **H** (application de la méthode de détanification à **TTI**)

A l'issue de cette première phase d'investigation phytochimique, la plante *Tambourissa trichophylla* a été introduite dans le programme de développement de Serdex.

Cela s'est traduit entre autres par le développement d'une méthode industrielle d'obtention de l'extrait **F3** de *Tambourissa trichophylla* et, par la suite, par la mise en œuvre d'un lot pilote industriel ayant fourni un extrait de **TTI** appelé **TTI PL002**.

Les processus industriels mis en œuvre pour extraire les composés des plantes sont sensiblement différents de ceux mis en place à petite échelle et les extraits obtenus par ces méthodes peuvent légèrement différer.

Les caractéristiques de l'extrait **TTI PL002** sont quasiment identiques en CCM à celles de **TTI F<sub>3</sub>**, si ce n'est que la proportion de flavonoïdes est légèrement supérieure dans le lot de **TTI PL002**. Cela nous a permis d'envisager d'isoler, à partir de cet extrait, d'autres molécules qui nous étaient inaccessibles dans **TTI F<sub>3</sub>** car trop peu concentrées.

Pour cela, nous avons appliqué la méthode de séparation des tanins par précipitation, mise au point pour les extraits de **ASA** et **APY**, à l'extrait **TTI PL002** (figure III 43).

L'extrait détanifié ainsi obtenu (environ 10 % en masse de l'extrait de départ) est fractionné sur colonne chromatographique de silice pour éliminer les oligomères de tanins résiduels puis à nouveau séparé par chromatographie de partage centrifuge dans les mêmes conditions que celles décrites pour l'extrait **TTI F<sub>3</sub>**. Une ultime étape de purification par HPLC semi-préparative a permis d'isoler le composé **H** (par élution isocratique 30 % MeCN dans 70 % d'eau additionnée de 0.1 % d'acide formique pendant 35 min, cf. chapitre V).



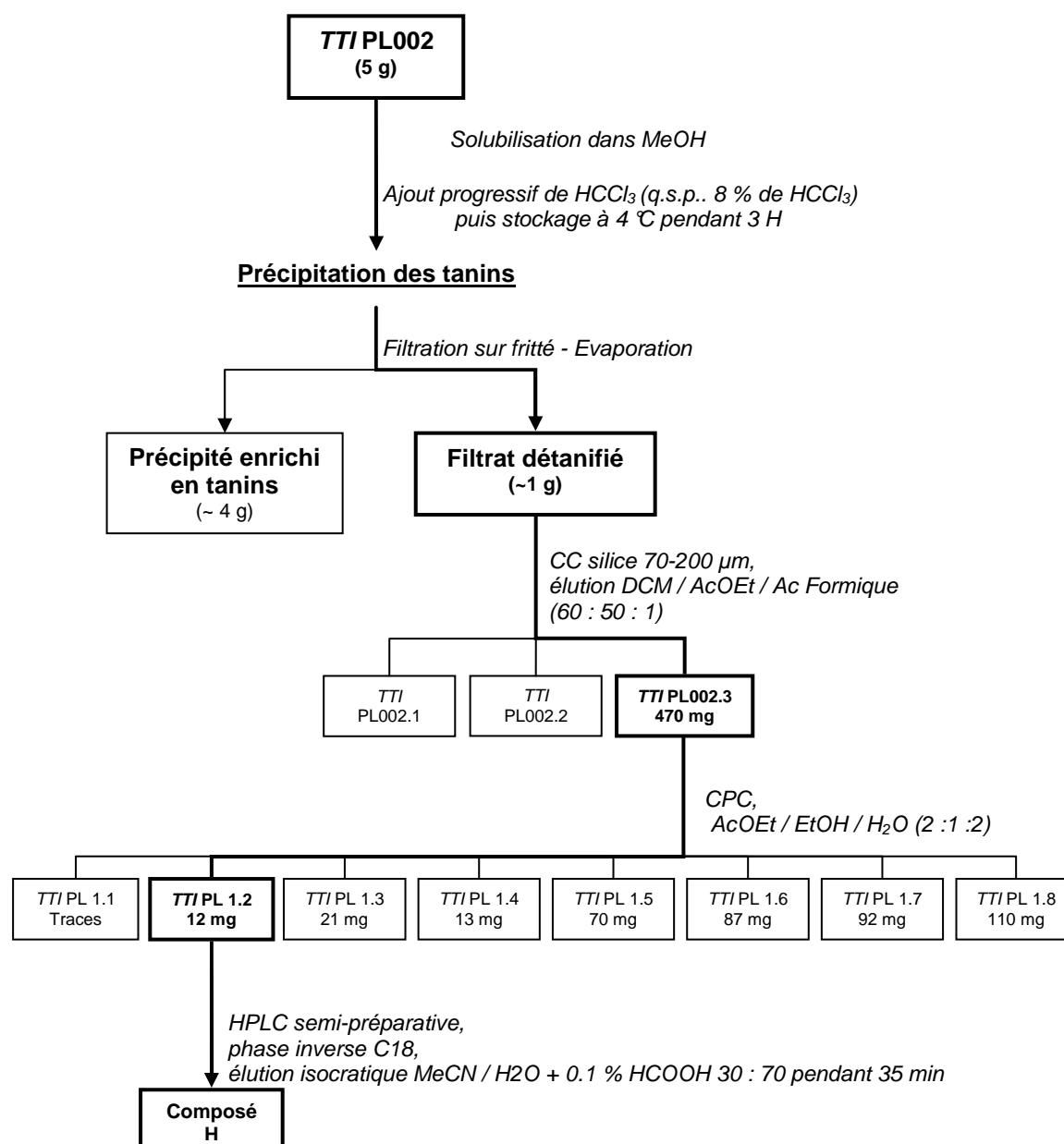


Figure III 42. Schéma de fractionnement de l'extrait TTI PL002.

### 3.1.3. Détermination de structure du composé **H** de *Tambourissa trichophylla*

Le composé **H** se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Ce composé réagit avec le réactif de Neu en affichant une fluorescence jaune sous UV à 365 nm laissant envisager une structure de type flavonoïde.

#### Spectrométrie de masse.

Le spectre de masse en ESI en mode négatif montre un ion *quasi*-moléculaire à  $m/z$  463 suggérant une masse atomique de 464 u (figure III 44). De plus, le fragment à  $m/z$  301  $[M-H-132]^-$  démontre la perte d'une unité hexose et la fragmentation observée peut correspondre à une génine de type quercétine.

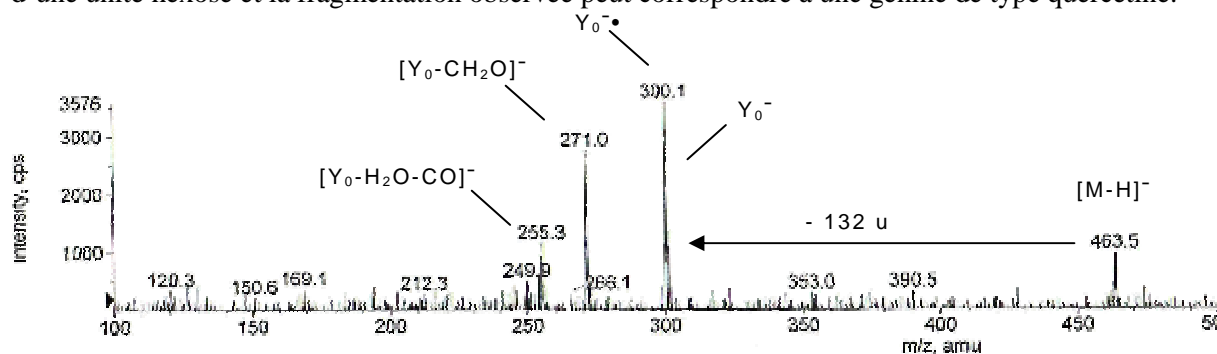


Figure III 43. Spectre ESI<sup>-</sup> du composé **H** (MeOH).

#### Spectrométrie de RMN.

Les spectroscopies de RMN-<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé **H** révèlent les signaux caractéristiques d'une génine quercétine (voir molécules **A**, **D** et **E**), ainsi que les six signaux d'un hexose (figures III 45 et III 46).

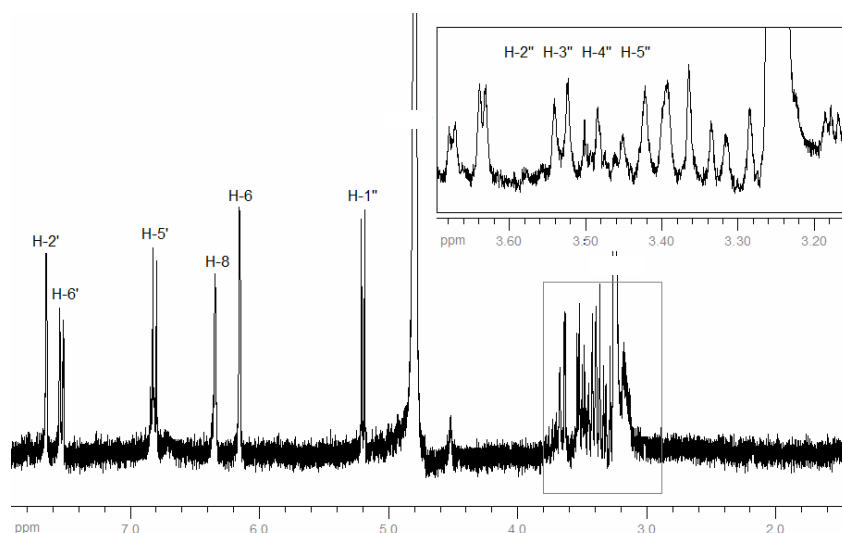


Figure III 44. Spectre de RMN-<sup>1</sup>H du composé **H** dans MeOD.

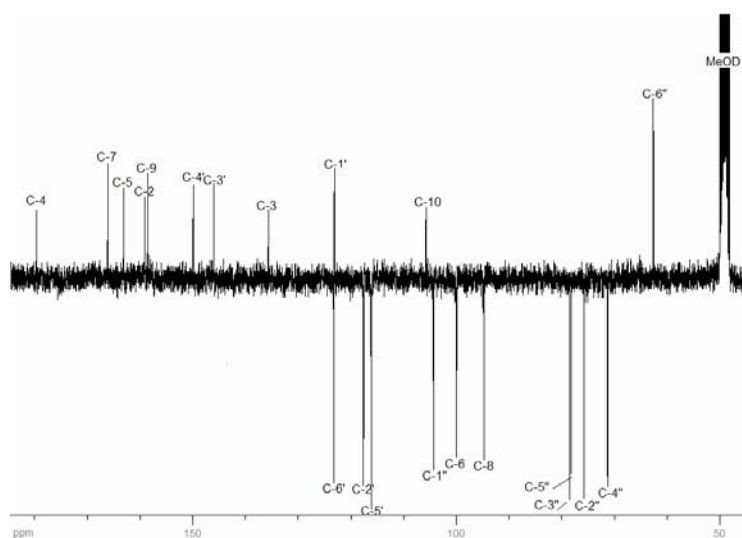


Figure III 45. Spectre RMN-<sup>13</sup>C du composé **H** dans MeOD.

Entre les spectres RMN-<sup>1</sup>H de **H** et **A** (quercétine-3-*O*-arabinofuranoside) ou **D** (quercétine-3-*O*-glucuronide), des différences significatives peuvent être détectées dans la région des protons du sucre (4-5 ppm). Les déplacements chimiques des protons du sucre ainsi que les constantes de couplage d'environ 7 Hz entre H-3'' et H-4'' ainsi qu'entre H-4'' et H-5'' indiquent la présence d'un substituant glucopyranosyl [Markham *et al.*, 1978].

Les déplacements chimiques caractéristiques d'un glucopyranoside ( $\delta_C$  77.0, 76.7, 74.3, 69.8 et 61.2 ppm pour C-2'', C-3'', C-4'', C-5'' et C-6'') sont également observables sur le spectre RMN-<sup>13</sup>C de **H** (figure III 46) [Vvedenskaya *et al.*, 2004]. La constante de couplage de  $J = 7.3$  Hz observée pour le proton anomérique de **H** suggère une liaison de configuration  $\beta$  entre le sucre à la génine.

Enfin, le spectre HMBC montre une corrélation entre le proton anomérique du glucopyranose H-1'' et le carbone C-3 de la génine (corrélation entre C-3 et H-1'').

Ces données, en accord avec celles de la littérature, nous ont permis d'identifier la molécule **H** comme étant la quercétine-3-*O*- $\alpha$ -glucopyranoside plus connue sous le nom de isoquercitrine.

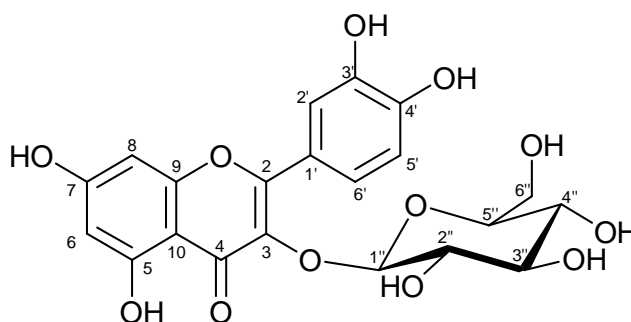


Figure III 46. Structure de la quercétine-3-*O*- $\alpha$ -glucopyranoside (composé **H**).

### 3.2. Conclusion de l'étude phytochimique de *TTI*

L'étude phytochimique des extraits de feuilles de *Tambourissa trichophylla*, nous a permis d'identifier quatre composés : la rutine (**E**), la nicotiflorine (**F**), la (-)-épicatechine (**G**) et l'isoquercitrine (**H**). Ces composés n'avaient jamais été décrits ni dans le genre ni dans l'espèce.

Nous avons choisi de retenir les composés **E**, **F** et **H** comme traceurs pour cet extrait. Nous décidons d'écarter le composé **G** ; en effet, il s'agit d'un monomère de proanthocyanidols et, de ce fait, sa teneur dans un extrait de *Tambourissa trichophylla* peut être amené à varier si un quelconque traitement de l'extrait (mauvaise condition de stockage par exemple...) entraînait une hydrolyse des polymères de proanthocyanidols contenus dans l'extrait.

Les trois flavonoïdes choisis ne sont pas spécifiques mais leur association dans des proportions définies peut l'être. De plus, ces molécules sont disponibles commercialement. Cela permet de pouvoir envisager leur dosage pour un contrôle quantitatif de l'extrait.

### 3.3. Méthode analytique de *TTI*

Suite à la mise en place du développement industriel des extraits de *Tambourissa trichophylla* par Serdex, nous avons pu obtenir plusieurs extraits *TTI F<sub>3</sub>* provenant de lots de plantes différents (dates et lieux de récolte différents).

Une méthode analytique par HPLC pour l'extrait *TTI F<sub>3</sub>* a donc été mise au point dans le but de vérifier la présence de trois composés choisis comme traceurs : les composés **E**, **F** et **H**. Les conditions analytiques de cette méthode sont décrites au chapitre V. Les résultats de l'analyse HPLC des trois lots de *TTI F<sub>3</sub>*, (appelés respectivement lot 0227, lot 0408 et lot 0418) sont présentés figure III 49.

Dans les trois lots, sur les chromatogrammes observés à 340 nm (longueur d'onde d'absorption maximale spécifique des flavonoïdes), nous retrouvons les trois molécules choisies comme traceurs : **E**, **F** et **H** avec des temps de rétention respectifs de 41, 45 et 47 min. Il est à noter que leurs proportions respectives semblent également peu varier mais un dosage serait nécessaire pour vérifier la reproductibilité de ces proportions d'un lot à l'autre.

Lorsque la longueur d'onde du chromatogramme est fixée à 276 nm, nous observons six pics bien résolus (pics **1** à **6** sur la figure III 49) et qui sont présents dans chacun des lots. Pour que ces composés servent à caractériser qualitativement l'extrait et fournir, avec les composés **E**, **F** et **H**, une « empreinte » HPLC de l'extrait *TTI F<sub>3</sub>*, ils doivent préalablement être identifiés.

Ainsi, cette méthode analytique est une méthode fiable, facile à mettre en œuvre en routine pour le contrôle de la qualité des extraits de *TTI*. Elle permet également un élargissement du nombre de

traceurs si cela devenait nécessaire (notamment par l'identification des composés 1 à 6), par exemple pour détecter une éventuelle falsification.

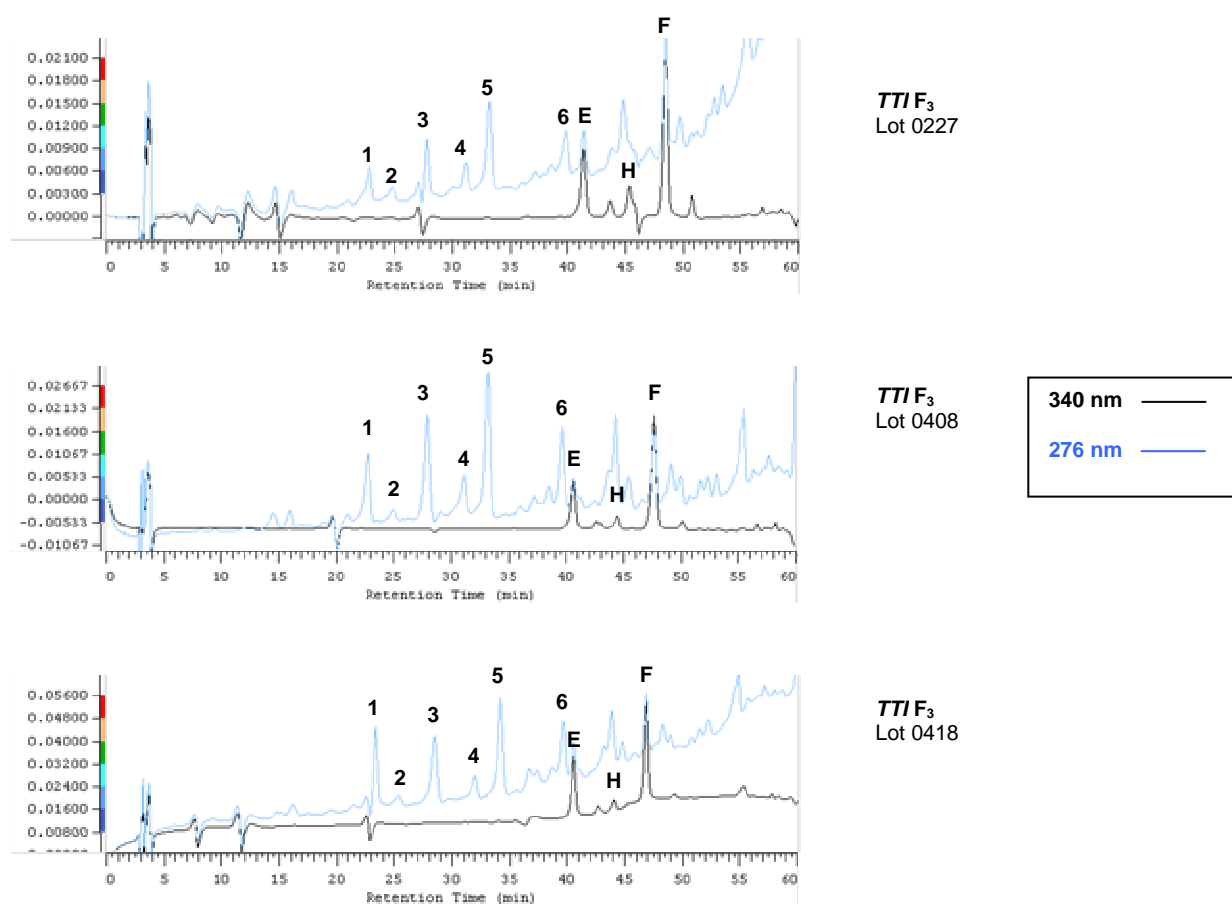


Figure III 47. Chromatogrammes HPLC comparés de trois lots de *TTI F<sub>3</sub>* à 340 nm et 276 nm.

## 4. Etude phytochimique des feuilles de *Embelia concinna* (ECC)

La plante *Embelia concinna* Baker a été choisie par Serdex pour son utilisation traditionnelle à Madagascar comme antifongique et antibactérien. C'est l'extrait **F<sub>3</sub>** qui a été retenu par le criblage pharmacologique pour être étudié phytochimiquement.

### 4.1. Fractionnement de l'extrait ECC **F<sub>3</sub>** et isolement des composés **I** à **S**

L'extrait **ECC F<sub>3</sub>** a subi un premier fractionnement par chromatographie d'absorption en phase normale sur colonne de silice éluée avec un gradient de cyclohexane / acétate d'éthyle pour donner six fractions (F3.1 à F3.6) (figure III 49) puis par un gradient acétate d'éthyle / méthanol pour donner cinq fractions (F3.7 à F3.11) (figure III 50).

Le suivi par CCM révélée avec le réactif de Neu ou le réactif à la vanilline sulfurique nous a permis de déterminer les fractions dans lesquelles se trouvaient les composés majoritaires ciblés lors du screening sur CCM.

Le composé majoritaire apolaire observé sur les CCM préliminaires se trouve dans les fractions F3.3 et F3.4. Ces deux fractions ont subi en parallèle des fractionnements par chromatographie d'exclusion sur gel de Sephadex® éluées au chloroforme puis au méthanol.

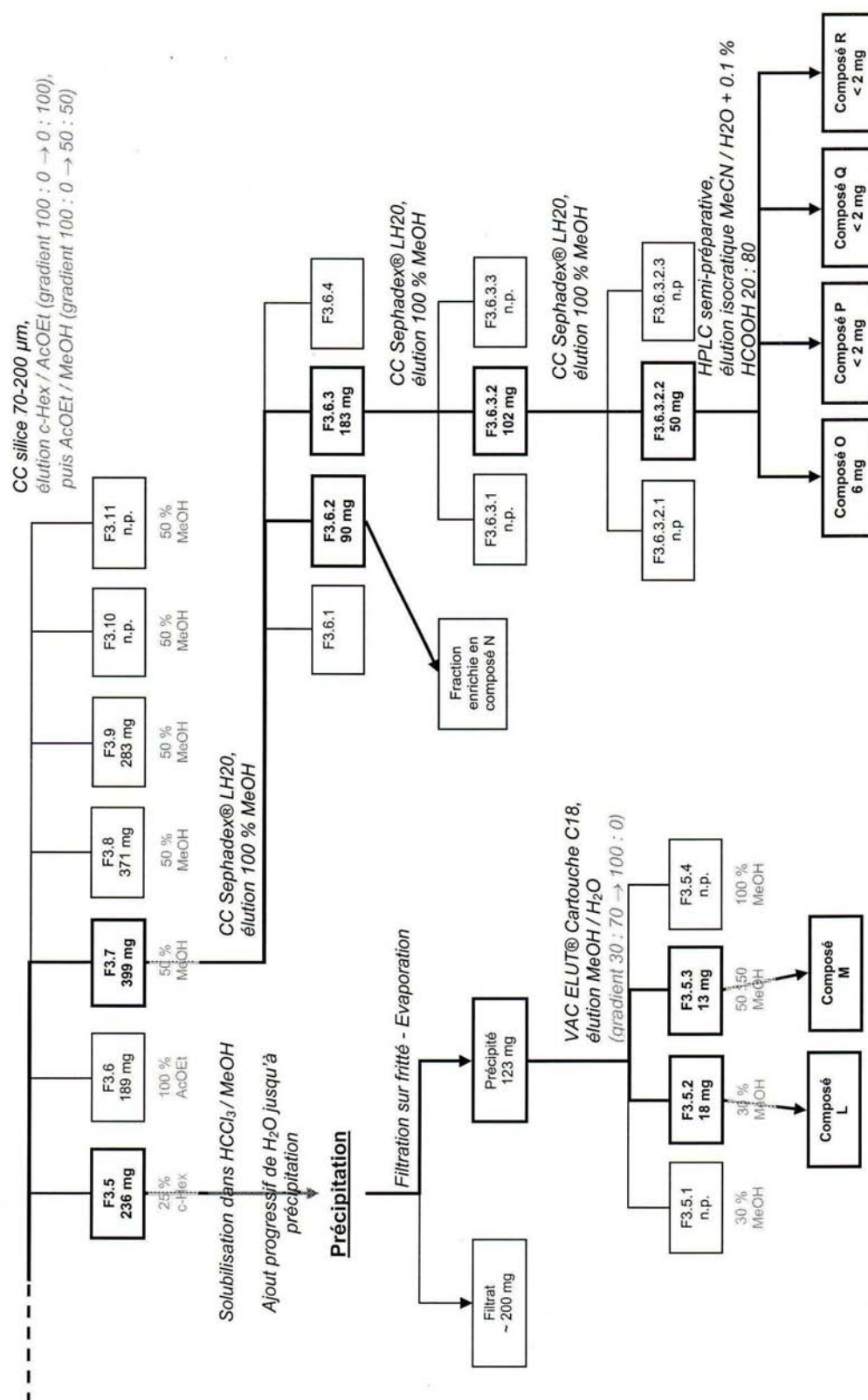
La fraction F3.3.2 a été fractionnée par chromatographie sur colonne ouverte de silice éluée par un gradient toluène / acétate d'éthyle pour donner quatre fractions.

Les fractions résultantes F3.3.2.2 et F3.4.3 présentaient en CCM des profils similaires et ont donc été rassemblées (sous le nom de F3.3.2.2). Cette fraction était très enrichie en un composé (appelé composé **I**) qui a été purifié par chromatographie sur colonne de silice éluée au toluène puis par CCM préparative (élution par toluène / méthanol) pour enfin donner le composé **I**.

Le composé **J** a été obtenu en purifiant la fraction F3.3.4 par chromatographie d'exclusion sur gel de Sephadex® en éluant avec du chloroforme puis du méthanol. Le composé **K** a, quant à lui, été isolé de la fraction F3.3.3 par chromatographie sur colonne de silice normale éluée par un gradient de cyclohexane et d'acétate d'éthyle.

La fraction F3.5, issue du premier fractionnement de **ECC F<sub>3</sub>**, renfermait majoritairement les flavonoïdes les plus apolaires de **ECC F<sub>3</sub>** mais aussi de pigments chlorophylliens. Cet extrait a été solubilisé dans un mélange chloroforme et méthanol à parts égales puis un ajout progressif d'eau a induit une précipitation des flavonoïdes. Le précipité ainsi obtenu a été purifié sur cartouche de silice C18 associée à une unité de filtration Vac Elut® pour donner les composés **L** et **M**.



Figure III 49. Schéma de fractionnement de l'extrait F<sub>3</sub> de ECC (suite).



Un fractionnement sur gel de Sephadex® de la fraction F3.6 a permis d'obtenir la fraction F3.6.2 qui présente un composé majoritaire appelé composé **N**.

Enfin, la fraction F3.6.3, qui contenait majoritairement les flavonoïdes de l'extrait de *ECC F<sub>3</sub>*, a subi des fractionnements successifs par filtration sur gel de Sephadex® puis une phase de purification par HPLC semi-préparative pour donner les composés **O**, **P**, **Q**, et **R** (conditions expérimentales décrites au chapitre V).

## 4.2. Détermination de structures des composés I à L isolés des sous-fractions apolaires de ECC F<sub>3</sub>

### 4.2.1. Détermination de structure du composé I

Le composé **I** a été obtenu sous forme d'une poudre blanche amorphe, soluble dans le chloroforme et dans les solvants apolaires. En CCM, il présente une coloration violette après révélation au réactif à la vanilline sulfurique et il réagit positivement au réactif Liebermann-Burchard, suggérant ainsi une structure de type triterpénique.

#### Spectrométrie de masse.

L'hypothèse d'une structure de type triterpène est étayée par l'étude en spectrométrie de masse du composé **I**.

Sur le spectre de masse en impact électronique (EI) en mode positif du composé **I**, nous observons l'ion moléculaire  $M^+$  à  $m/z$  426. Le spectre EI nous apporte également des informations sur la structure de ce composé. En effet, en plus du pic de l'ion moléculaire, nous observons la présence d'autres ions, caractéristiques d'une réaction de type rétro Diels-Alder sur un triterpène possédant une insaturation (figure III 51) : un ion à  $m/z$  302 et le pic de base du spectre à  $m/z$  204.

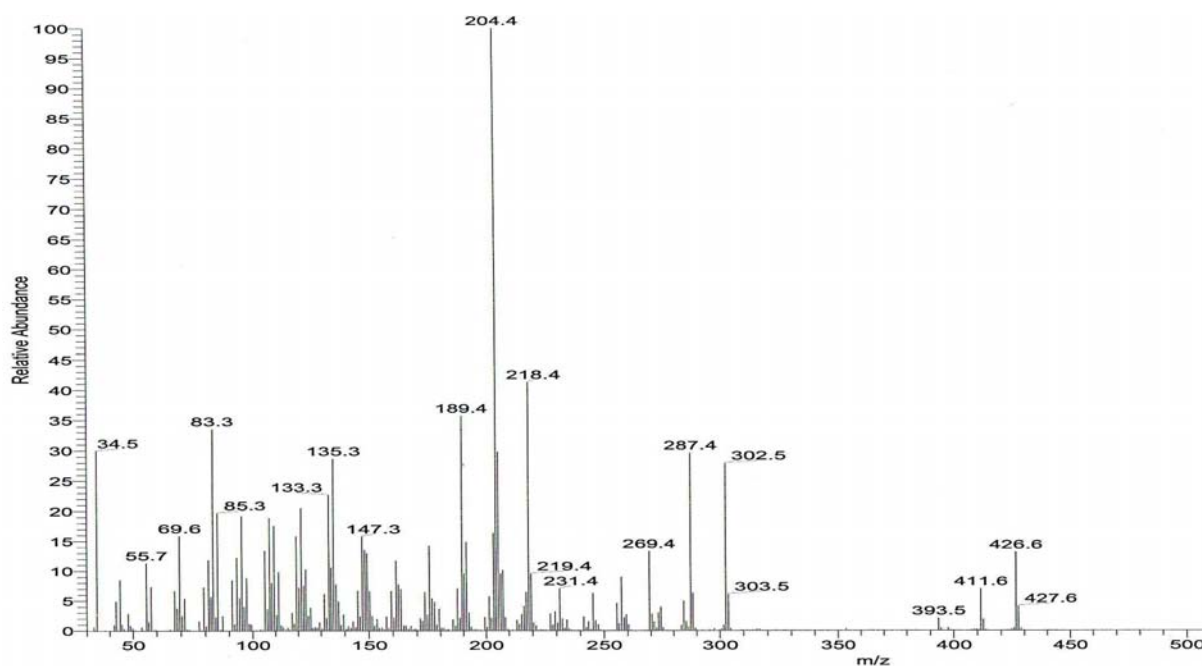
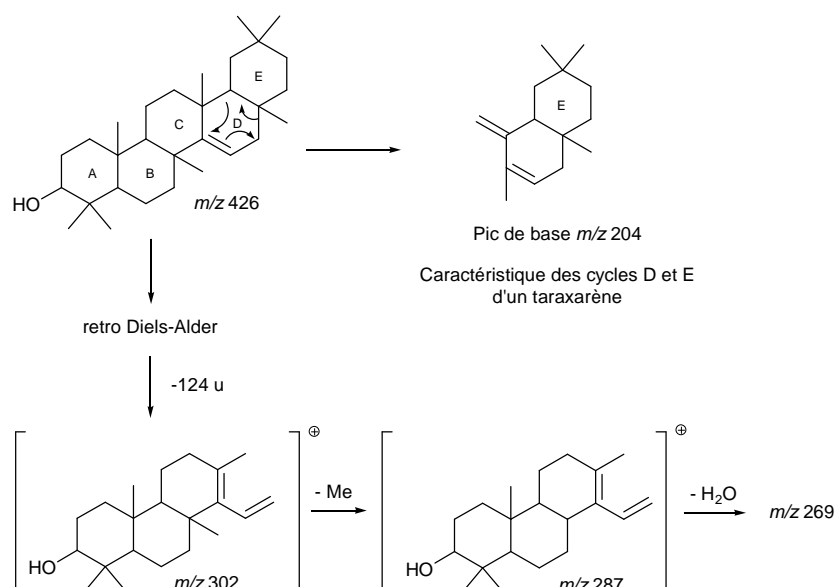


Figure III 50. Spectre de masse en EI en mode positif du composé **I** ( $\text{HCCl}_3$ ).

Cette fragmentation est caractéristique d'une insaturation en position 14-15 d'un triterpène pentacyclique orientant vers une structure de type taraxarène ( $\Delta^{14}$ ) [Budzikiewicz *et al.*, 1963]. Elle est illustrée à la figure suivante.



**Figure III 51. Fragmentation par EIMS et réaction de retro Diels-Alder sur un taraxarène d'après Budzikiewicz *et al.* .**

L'ion 302 provient directement de la décomposition par réaction de rétro Diels-Alder du cycle D d'un taraxarène. Cet ion est accompagné d'un ion à  $m/z$  287 formé par la perte du groupement méthyle en C-8 [Misra *et al.*, 1984] et d'un autre ion dû une perte d'H<sub>2</sub>O ( $m/z$  269), indiquant que les cycles A, B et C portent un groupement hydroxyle, probablement en position C-3 pour des raisons biogénétiques.

Le pic de base ( $m/z$  204) est également caractéristique et dérive des cycles D et E. Cet ion est accompagné d'un autre à  $m/z$  189 [204-Me] témoignant d'un réarrangement ayant provoqué la perte du méthyle en position 17 [Budzikiewicz *et al.*, 1963].

On peut ainsi envisager la formule brute C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O pour le composé **I**, soit 6 degrés d'insaturation, compatible avec un triterpène pentacyclique.

### Spectrométrie de RMN.

Le spectre de RMN-<sup>1</sup>H du composé **I** présente huit signaux de méthyle formant des singulets entre 0.8 et 1.2 ppm confirmant la présence des huit méthyles d'un squelette triterpénique (figure III 53).

Nous observons également la présence du signal d'un groupement hydroxyle à  $\delta_H$  3.19 ppm et le signal d'un proton oléfinique à  $\delta_H$  5.53 ppm (*dd*, 3.2, 8.2) que nous pouvons situer en position 15 grâce aux éléments apportés par la spectrométrie de masse.

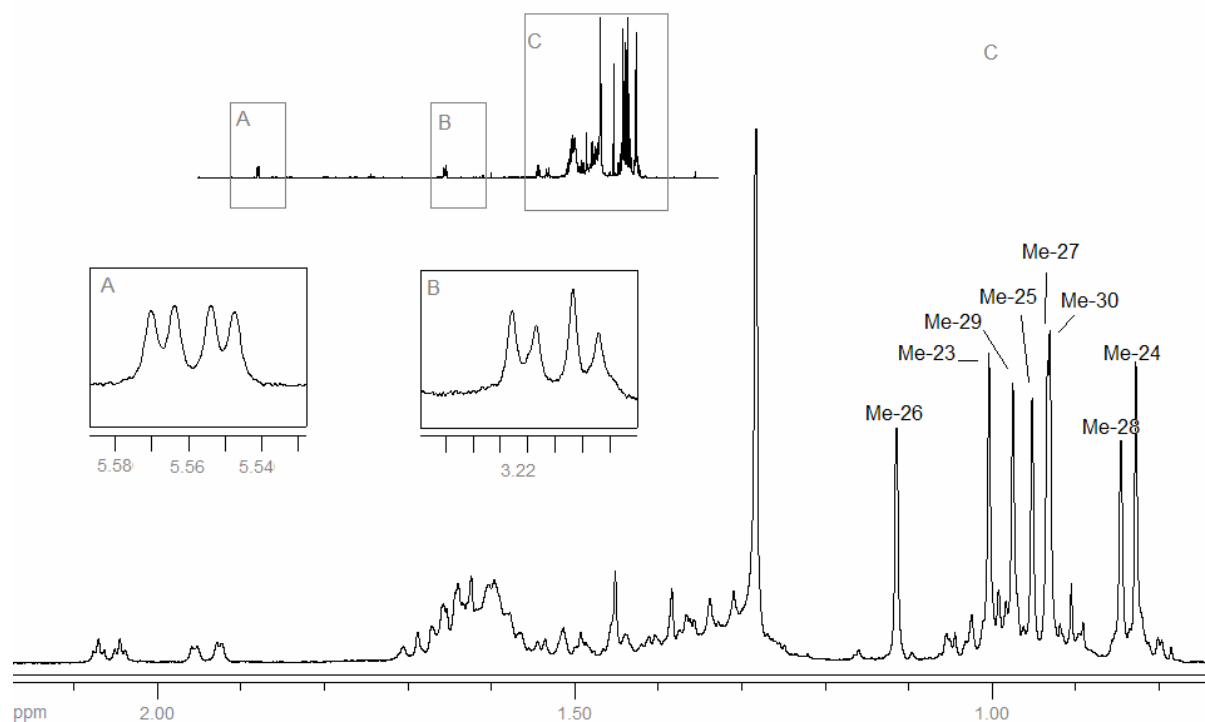


Figure III 52. Spectre de RMN- $^1\text{H}$  de I dans  $\text{CDCl}_3$ .

Les 30 signaux du spectre de RMN- $^{13}\text{C}$  du composé I (figure III 54) confirment la présence d'un triterpène avec sept méthyles dont l'expérience HSQC a permis de définir les corrélations protons. Pour des raisons biogénétiques, sur un taraxarène, ces méthyles sont portés par les carbones quaternaires C-4 (Me-23 à  $\delta_{\text{C}}$  28.0 /  $\delta_{\text{H}}$  1.0 ppm et Me-24 à  $\delta_{\text{C}}$  15.5 /  $\delta_{\text{H}}$  0.82 ppm), C-10 (Me-25 à  $\delta_{\text{C}}$  15.4 /  $\delta_{\text{H}}$  0.94 ppm), C-8 (Me-26 à  $\delta_{\text{C}}$  25.9 /  $\delta_{\text{H}}$  1.12 ppm), C-13 (Me-27 à  $\delta_{\text{C}}$  29.9 /  $\delta_{\text{H}}$  0.92 ppm), C-17 (Me-28 à  $\delta_{\text{C}}$  29.8 /  $\delta_{\text{H}}$  0.84 ppm) et C-20 (Me-29 à  $\delta_{\text{C}}$  33.4 /  $\delta_{\text{H}}$  0.97 ppm et Me-30 à  $\delta_{\text{C}}$  21.3 /  $\delta_{\text{H}}$  0.92 ppm) [Chaturvedula *et al.*, 2003 ; Laphookhieo *et al.*, 2004].

Par ailleurs, la double liaison est confirmée par la présence d'un carbone quaternaire oléfinique C-14 à  $\delta_{\text{C}}$  158.1 ppm et du CH oléfinique à  $\delta_{\text{C}}$  116.0 /  $\delta_{\text{H}}$  5.53 ppm. La position de cette double liaison est confirmée par l'observation des corrélations HMBC (figure III 55).

Le déplacement chimique du  $\text{CH}_2$  à  $\delta_{\text{C}}$  79.0 /  $\delta_{\text{H}}$  3.20 ppm confirme la présence d'un groupement hydroxyle. Les signaux caractéristiques du CH en position 5 à  $\delta_{\text{C}}$  55.3 /  $\delta_{\text{H}}$  0.70 ppm montrent que la décaline A/B est une *trans*-décaline.

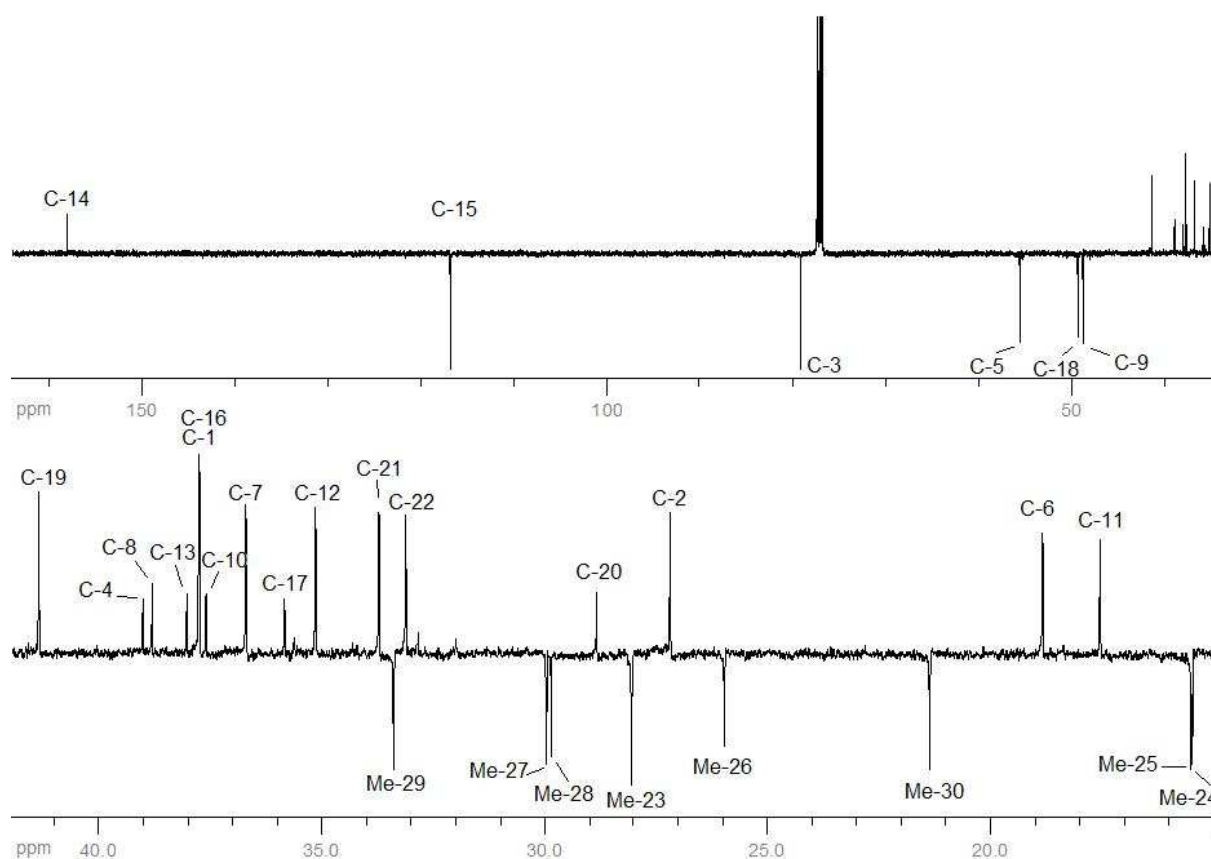


Figure III 53. Spectre de RMN- $^{13}\text{C}$  de I dans  $\text{CDCl}_3$ .

Toutes les valeurs de protons et carbones ont été finalement attribuées par l'analyse des spectres HSQC et HMBC du composé I. L'observation de couplages  $^2J_{\text{H-C}}$  et  $^3J_{\text{H-C}}$  du spectre HMBC à partir des méthyles permet d'élucider la structure du composé I.

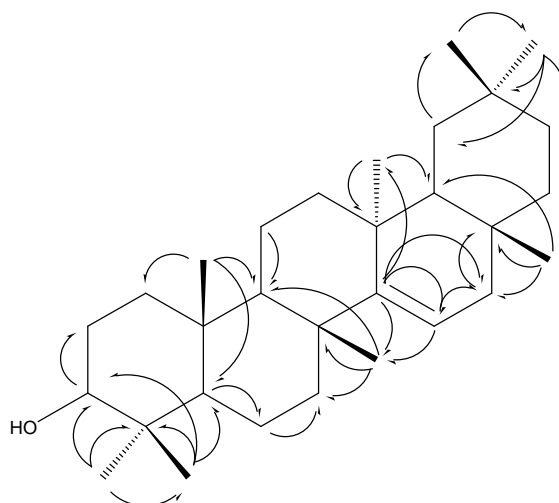


Figure III 54. Principales corrélations observées sur le spectre HMBC du composé I.

Les valeurs des constantes de couplage entre H-3 et les protons H-2 (*dd*,  $J = 4.6$  Hz,  $J = 11.2$  Hz) impliquent un couplage *trans-diaxial* entre H-3 et le proton *axial* de H-2 permettant de placer le groupement hydroxyle OH-3 en position  $\beta$  *équatoriale*.

Finalement, les corrélations observées sur le spectre NOESY du composé **I** nous ont permis de définir la configuration spatiale du composé **I**. En effet, nous observons des couplages NOESY (figure III 57) entre le proton H-3 *axial* et les protons du Me-23 ainsi que le H-5 *axial* qui couple lui-même avec H-9. Enfin, les couplages NOESY entre Me-24 et Me-25, Me-25 et Me-26, Me-26 et H-18, H-18 et Me-30 et Me-28 permettent de placer ces groupements en position *axiale*.

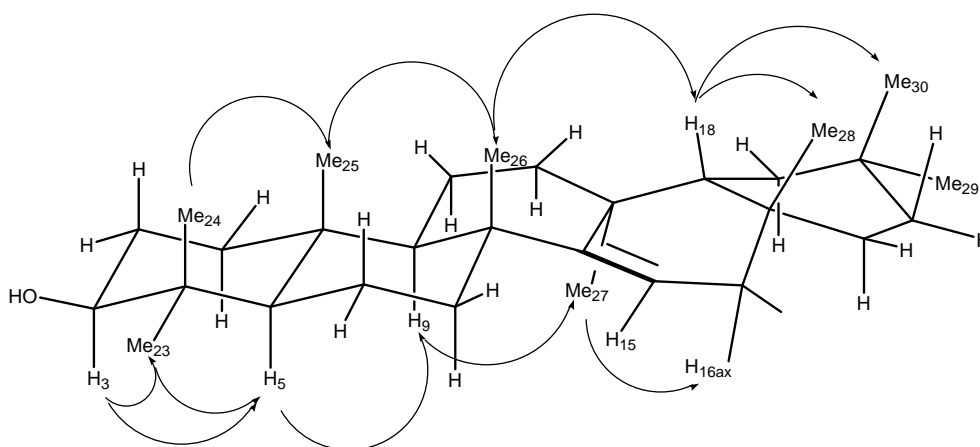


Figure III 55. Principales corrélations observées sur le spectre NOESY du composé **I**.

Ainsi, en accord avec les données de la littérature, nous pouvons identifier le composé **I** comme étant le 14-taraxeren-3 $\beta$ -ol ou taraxérol.

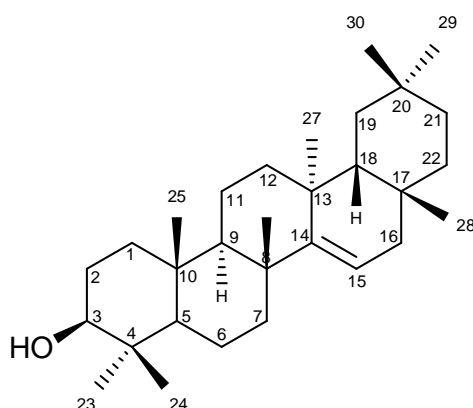


Figure III 56. Structure du 14-taraxérène-3 $\beta$ -ol (composé **I**).

#### 4.2.2. Détermination de structure du composé J

Le composé **J** se présente sous forme d'une huile rougeâtre. Il est soluble dans le chloroforme et les solvants apolaires. Révélé en CCM par pulvérisation de vanilline sulfurique, ce composé prend une teinte rouge terne.

##### Spectrométrie de masse.

Le spectre de masse ESI<sup>-</sup> du composé **J** montre un ion à  $m/z$  341 [M-H]<sup>-</sup> indiquant une masse moléculaire de 342 u et laissant envisager la formule brute C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> (figure III 58).

La fragmentation de l'ion *quasi*-moléculaire engendre la formation de deux ions fragments à  $m/z$  122 et  $m/z$  135.

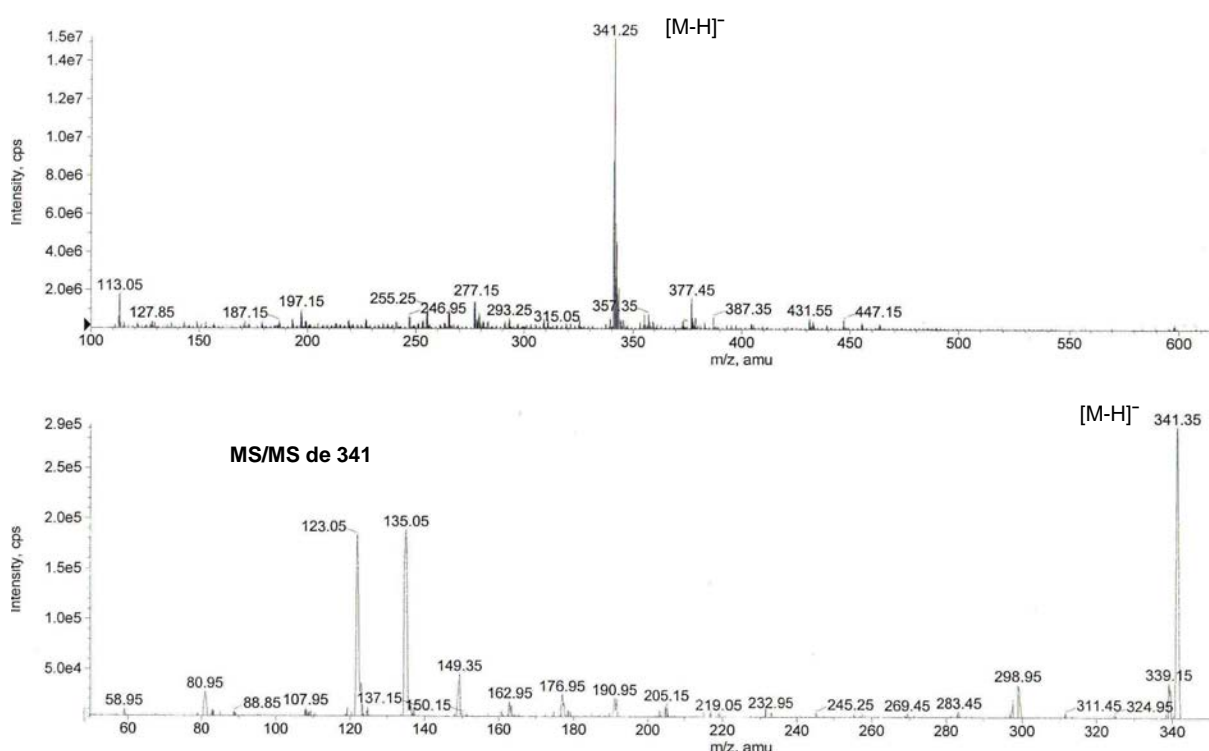


Figure III 57. Spectre de masse ESI<sup>-</sup> du composé **J** (MeOH).

##### Spectrométrie de RMN.

Le spectre RMN-<sup>1</sup>H du composé **J** présente neuf massifs de signaux (figure III 59).

Dans la zone des signaux des protons aromatiques, nous observons deux signaux correspondant aux protons d'un cycle aromatique : un doublet à  $\delta_H$  6.26 ppm ( $J = 2.2$  Hz) intégrant pour deux protons et un triplet à 6.19 ppm ( $J = 2.2$  Hz) intégrant pour un proton.

Nous pouvons en déduire que nous sommes en présence d'un cycle aromatique trisubstitué dont les protons sont situés en position *meta* les uns par rapport aux autres.

Dans cette zone, se situe également le signal d'un multiplet, entre  $\delta_H$  5.31 et 5.45 ppm intégrant pour six protons oléfiniques.

Les six autres massifs se situent dans la zone des protons aliphatiques. Nous observons un signal intégrant pour quatre protons et formant un triplet à  $\delta_H$  2.83 ppm ( $J = 5.4$  Hz), et un multiplet intégrant pour quatre protons entre 2.03 et 2.14 ppm ainsi qu'un autre multiplet intégrant pour huit protons 1.29 et 1.41 ppm.

En outre, le spectre RMN- $^1H$  du composé présente un signal à  $\delta_H$  1.00 ppm intégrant 3 H et formant un triplet ( $J = 7.5$  Hz), caractéristique d'un groupement éthyle.

Enfin, nous observons la présence d'un triplet à  $\delta_H$  2.50 ppm ( $J = 7.3$  Hz) intégrant pour un proton couplant avec un quintuplet à  $\delta_H$  1.59 ppm intégrant pour deux protons également. De ce fait, nous pouvons supposer qu'il s'agit de deux  $CH_2$  d'une chaîne aliphatique en position respectivement  $\alpha$  et  $\beta$  d'un groupement électroattracteur (cycle aromatique ou double liaison par exemple).

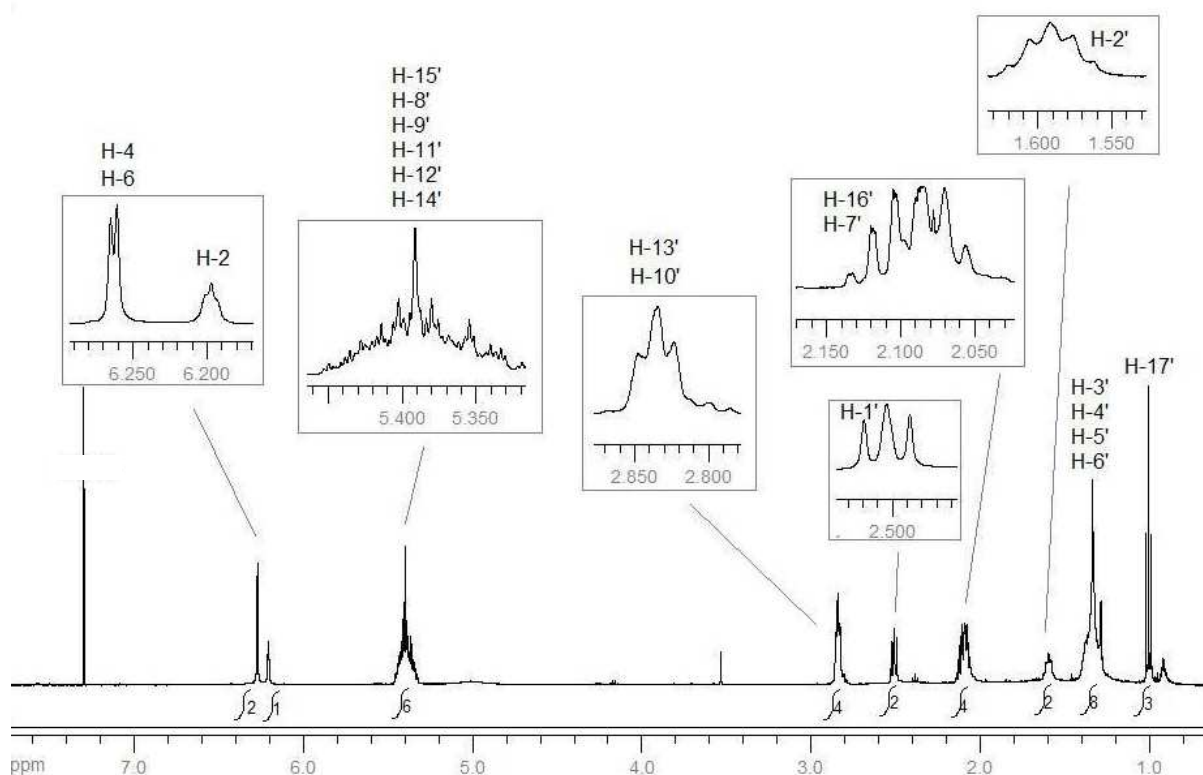


Figure III 58. Spectre de RMN- $^1H$  du composé J dans  $CDCl_3$ .

Sur le spectre de RMN- $^{13}C$  du composé J (figure III 60), nous distinguons les six carbones d'un cycle aromatique. D'une part, deux signaux de CH aromatiques superposés à  $\delta_C$  108.0 ppm et un CH aromatique à  $\delta_C$  100.1 ppm corrélant en HSQC avec les trois protons aromatiques respectivement à  $\delta_H$  6.26 et 6.19 ppm et, d'autre part, trois carbones quaternaires dont deux superposés dont les



déplacements chimiques révèlent que les substituants du cycle aromatique sont deux groupements hydroxyles ( $\delta_C$  156.6 ppm) et une chaîne carbonée ( $\delta_C$  146.1 ppm).

La superposition des signaux des carbones quaternaires confirme la tri-substitution en *meta* et nous permet de placer les groupements OH en position 1 et 3. Le cycle aromatique du composé **J** est donc un noyau résorcinol.

Cinq signaux de carbones oléfiniques sont présents entre 125 et 140 ppm. Le spectre HSQC indique qu'ils correspondent aux six protons oléfiniques et que donc, deux signaux de carbones sont superposés. Ainsi, ces six signaux représentent trois doubles liaisons.

Nous notons également la présence de huit CH<sub>2</sub> entre 20 et 36 ppm et d'un CH<sub>3</sub> à  $\delta_C$  14.3 ppm.

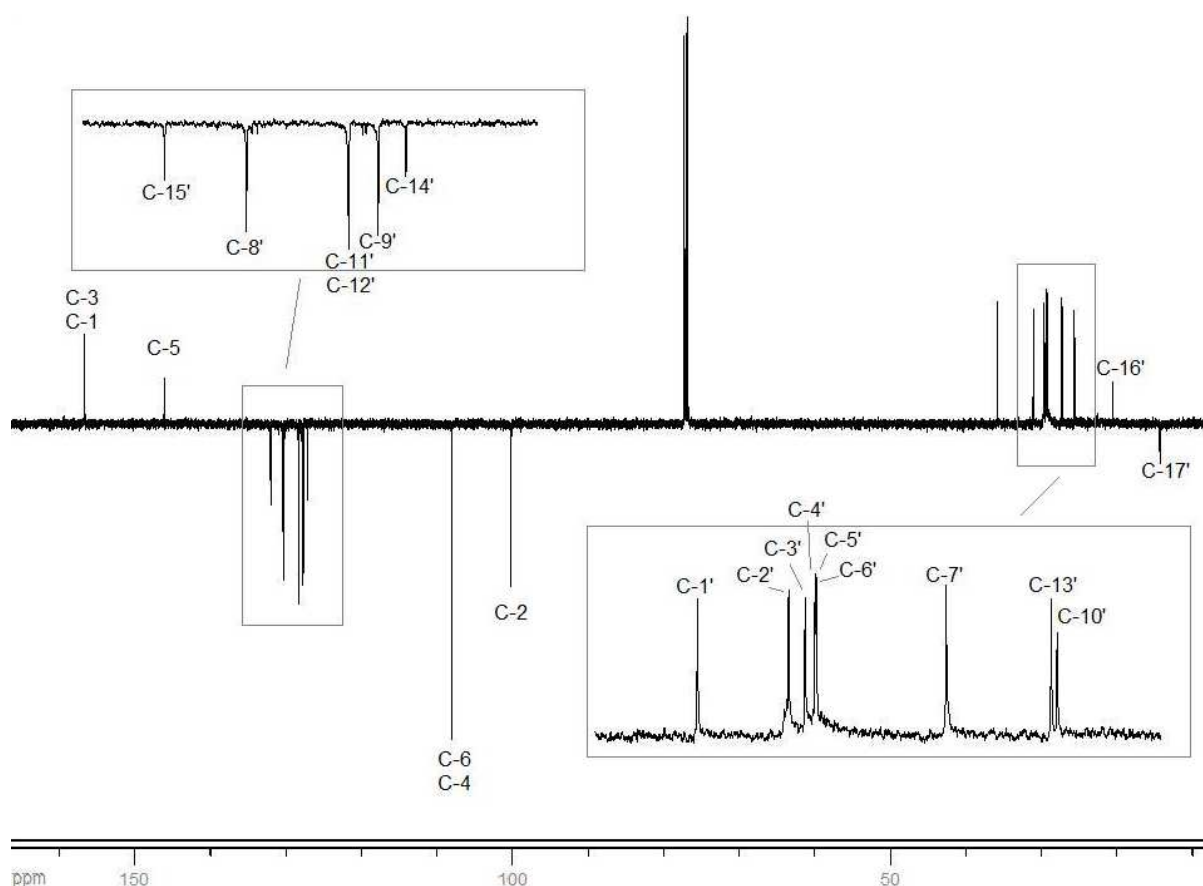


Figure III 59. Spectre de RMN-<sup>13</sup>C du composé **J** dans CDCl<sub>3</sub>.

Ainsi, de l'étude des spectres de RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>13</sup>C, nous pouvons déduire que le composé **J** est un résorcinol substitué en position 5 par une chaîne alkyle non ramifiée à 17 carbones et comportant trois doubles liaisons, ce qui est en accord avec les informations apportées par le spectre de masse. En effet, le pic de base du spectre MS/MS du composé **J** (ESI<sup>-</sup>) à  $m/z$  135 [C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>-H]<sup>-</sup> correspond à la rupture de la chaîne alkyle en d'une double liaison [Suzuki *et al.*, 1997] ; le pic à  $m/z$  123 correspond à l'ion dihydroxytropylium [C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>(OH)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, (figure III 61) [Kozubek et Tyman, 1999 ; Wu *et al.*, 2002].

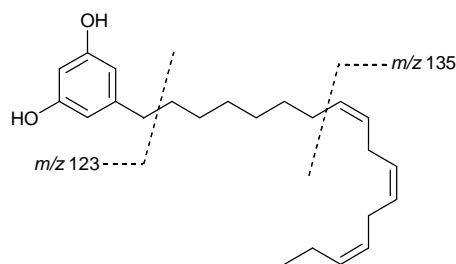


Figure III 60. Fragmentation du composé J observée sur le spectre ESI<sup>-</sup>.

Les corrélations HMBC (figure III 62) entre les carbones C-4 et C-6 et les protons à  $\delta_H$  2.50 ppm nous permettent d'identifier le CH<sub>2</sub>-1' ( $\delta_C$  35.8 /  $\delta_H$  2.50 ppm). Les carbones C-1' et C-5 présentent des corrélations avec les protons à  $\delta_H$  1.59 ppm permettant d'identifier le CH<sub>2</sub>-2' ( $\delta_C$  31.0 /  $\delta_H$  1.59 ppm) (figure III 63 A).

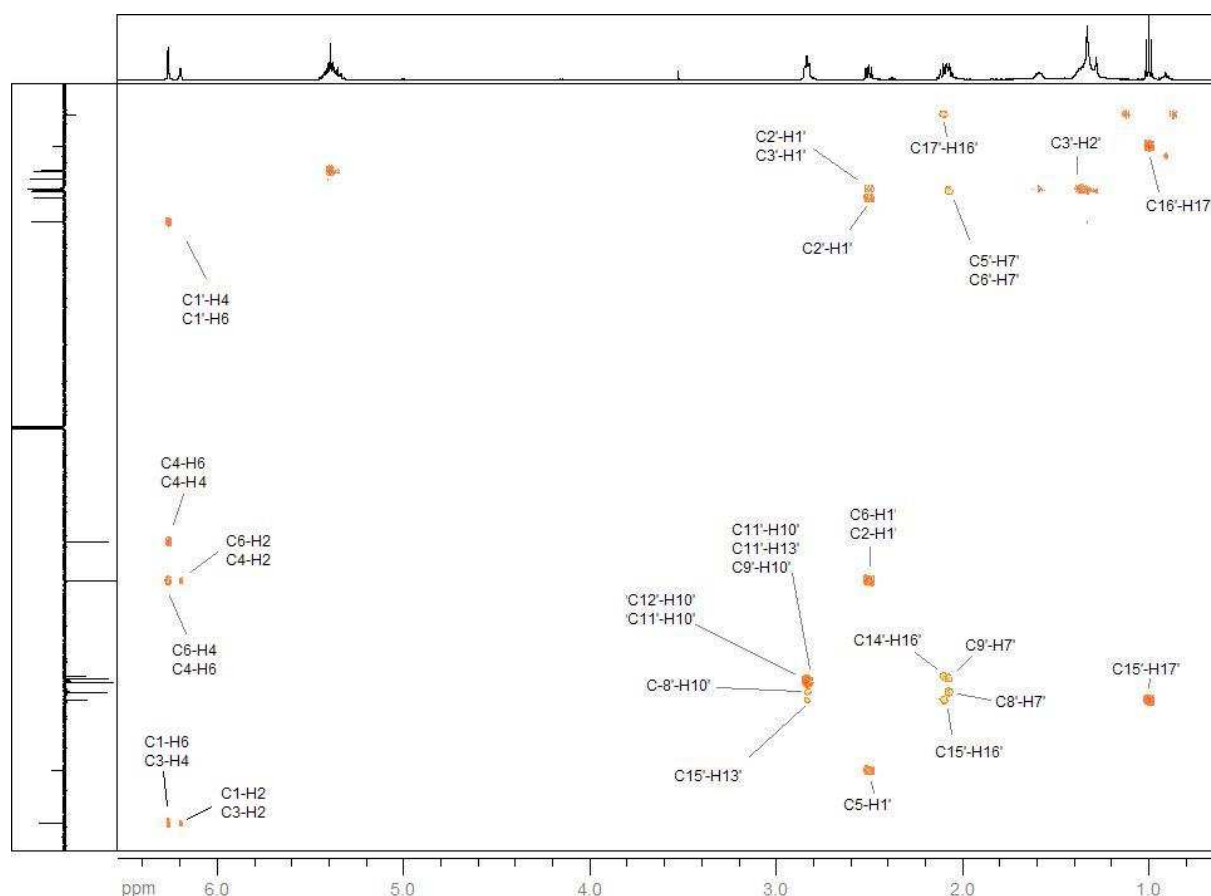


Figure III 61. Spectre HMBC du composé J.

Les corrélations HMBC à partir du CH<sub>3</sub> terminal conduisent à distinguer trois sous-unités allyliques successives ainsi que de placer les doubles liaisons entre les positions 8' et 9', 11' et 12' et 14' et 15' (figure III 62 B). Les signaux de RMN-<sup>1</sup>H des quatre CH<sub>2</sub> des positions 3', 4', 5' et 6' étant superposés, nous ne pouvons les distinguer et les valeurs de  $\delta$  sont interchangeables [Chaturvedula *et al.*, 2003].

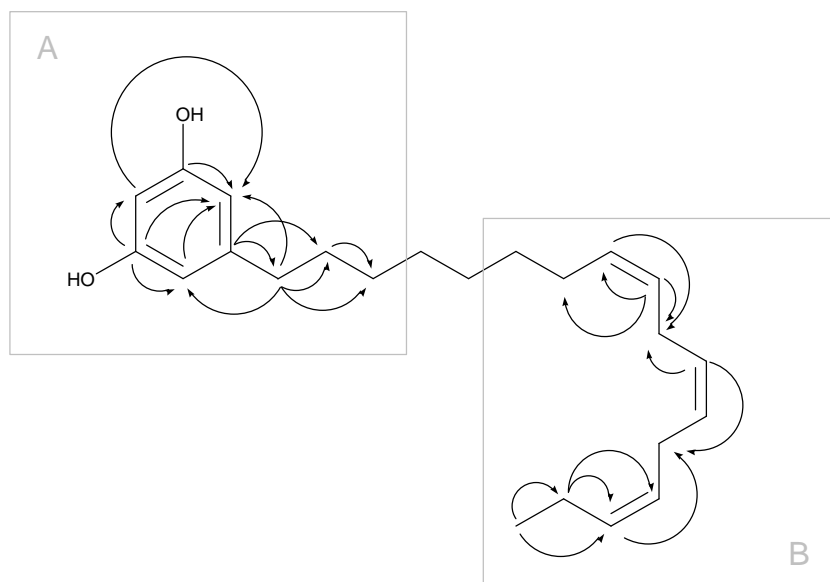


Figure III 62. Principales corrélations HMBC du composé J.

La stéréochimie des doubles liaisons a été déterminée en observant la différence entre le déplacement chimique des carbones en  $\alpha$  des doubles liaisons et le déplacement chimique de leurs analogues dans la même chaîne carbonée saturée et non en se référant aux constantes de couplage car les signaux sont superposés (dans le cas contraire, les constantes de couplages observées seraient  $J \sim 6$  Hz pour une liaison (Z) et  $J \sim 12$  Hz pour une liaison (E)).

Les  $\text{CH}_2$  d'une chaîne carbonée saturée ont des déplacements chimiques compris entre 20 et 30 ppm dans  $\text{CDCl}_3$ . Le déplacement des valeurs  $\delta_{\text{C}}$  des  $\text{CH}_2$  allyliques de quelques ppm vers les hauts champs indique une configuration (Z) de la double liaison [Suzuki *et al.*, 1996 ; Lund *et al.*, 1997 ; Suzuki *et al.*, 1997].

Ainsi, nous identifions le composé **J** comme étant le 5-(8'(Z),11'(Z),14'(Z)-heptadécatrienyl) résorcinol. Cette molécule a déjà été isolée de *Philodendron scandens* et est rapportée pour la première fois dans le genre *Embelia*.

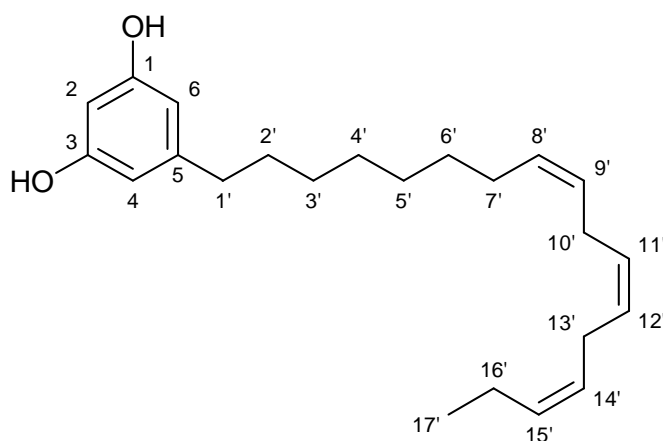


Figure III 63. Structure du 5-(8'(Z),11'(Z),14'(Z)-heptadécatrienyl) résorcinol.

### 4.2.3. Détermination de structure du composé K

Le composé **K** se présente sous forme huileuse. Il est soluble dans le chloroforme et les solvants apolaires. Révélé en CCM par pulvérisation de vanilline sulfurique, ce composé prend une teinte rouge rosé.

#### Spectrométrie de RMN.

Tous les spectres de RMN du composé **K** (figure III 65) présentent d'importantes similitudes avec ceux du composé **J** (5-(8'(Z),11'(Z),14'(Z)-heptadécatrienyl) résorcinol). En effet, nous pouvons observer tous les signaux correspondant à la chaîne alkyle non ramifiée à 17 carbones avec trois doubles liaisons (*cf.* paragraphe 4.2.2). Cependant, les signaux correspondant au noyau résorcinol (six carbones aromatiques et trois protons aromatiques) sont absents. Toutefois, nous notons la présence, sur le spectre de RMN- $^{13}\text{C}$ , du signal d'un carbonyle à  $\delta_{\text{C}}$  180.5 ppm.

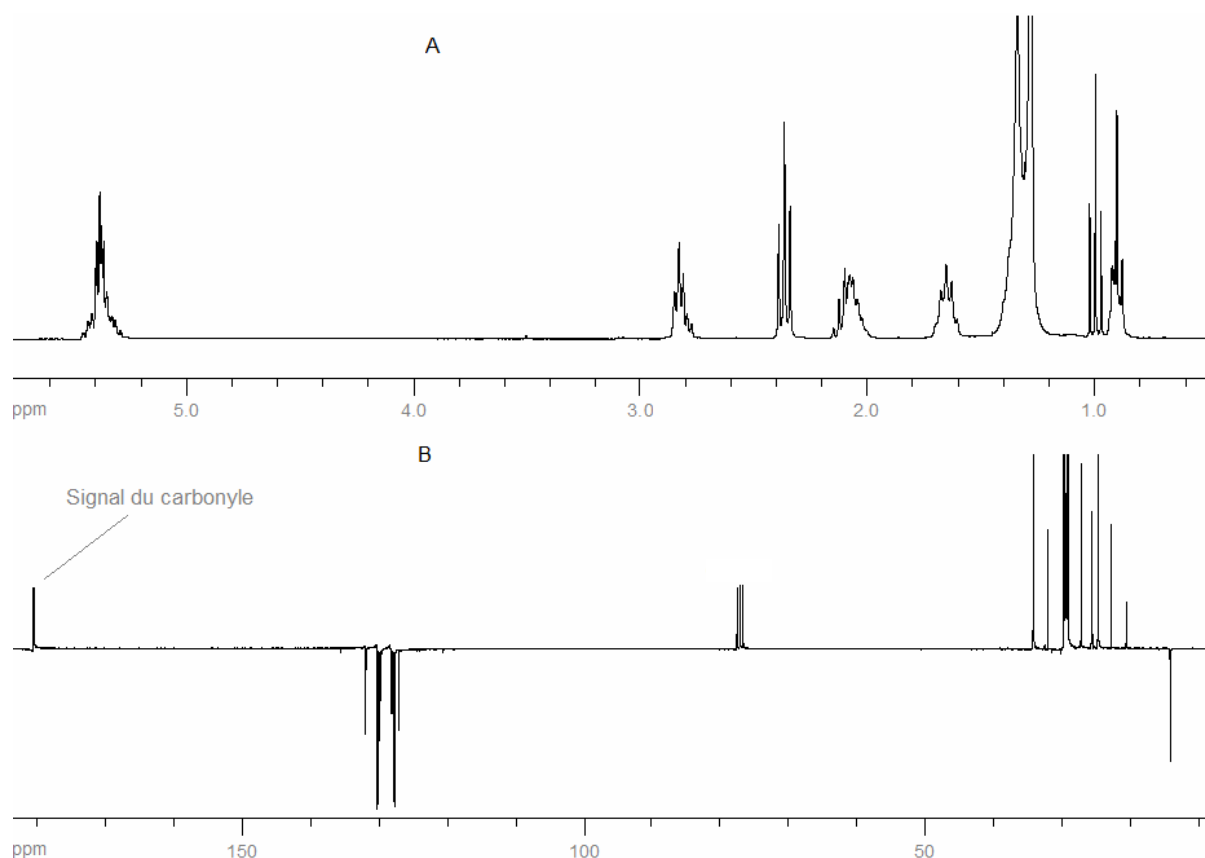
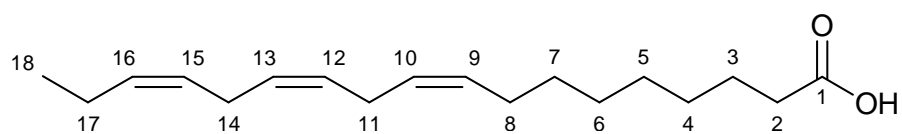


Figure III 64. Spectres de RMN- $^1\text{H}$  (A) et de RMN- $^{13}\text{C}$  (B) du composé **K** dans  $\text{CDCl}_3$ .

Ainsi, grâce à ces éléments et aux données de la spectrométrie de masse, nous pouvons établir la formule brute  $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$  pour le composé **K**. Les deux oxygènes appartiennent à un acide carboxylique et, les données spectrales concordant avec celles de la littérature, nous pouvons identifier le composé **K** comme étant l'acide 9(Z),12(Z),15(Z)-octadécatriénoïque ou acide linoléinique, acide gras essentiel [Vatèle *et al.*, 1998 ; Cao *et al.*, 2007].



**Figure III 65. Structure de l'acide linolénique (composé K).**

### 4.3. Détermination de structure des composés L et M par LC-MS.

Les composés **L** et **M** se présentent chacun sous la forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol.

Ils montrent tous deux des profils de spectre UV caractéristiques des flavonoïdes avec des absorptions maximales respectives dans le méthanol de 245 nm et 360 nm pour **L** et de 265 nm et 365 nm pour **M**. En CCM, le composé **L** présente un  $R_f$  et une fluorescence jaune à 366 nm (après pulvérisation par le réactif de Neu) identiques à la quercétine. Le  $R_f$  et la fluorescence verte (UV 366 nm, réactif de Neu) du composé **M** sont identiques à ceux du kaempférol.

Nous avons donc choisi de comparer en LC-MS les données analytiques des composés **L** et **M** avec respectivement les témoins quercétine et kaempférol (conditions chromatographiques : cf. chapitre v). Les temps de rétention ( $t_R$ ), les masses (respectivement 302 et 286 pour **L** et **M**) se sont révélées identiques aux deux témoins.

Les figures III 67 et III 68 et le tableau III 2 présentent les ions obtenus par fragmentations MS/MS des composés L et M et des témoins.

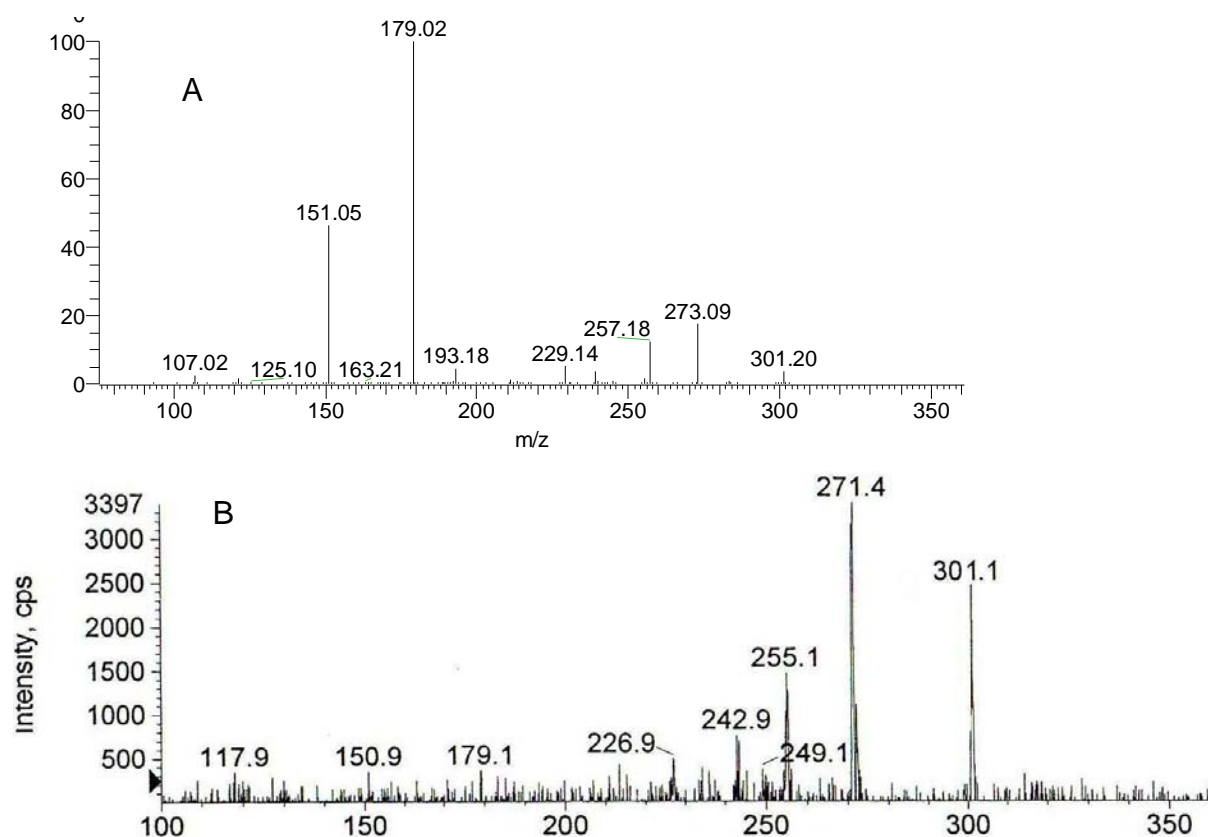


Figure III 66. A. Fragmentation MS/MS de l'ion  $m/z$  301  $[M-H]^-$  du témoin quercétine (ESI<sup>-</sup>, trappe d'ion, MeOH). B. Fragmentation MS/MS de l'ion  $m/z$  301  $[M-H]^-$  du composé **L** (ESI<sup>-</sup>, triple quadripôle, MeOH).

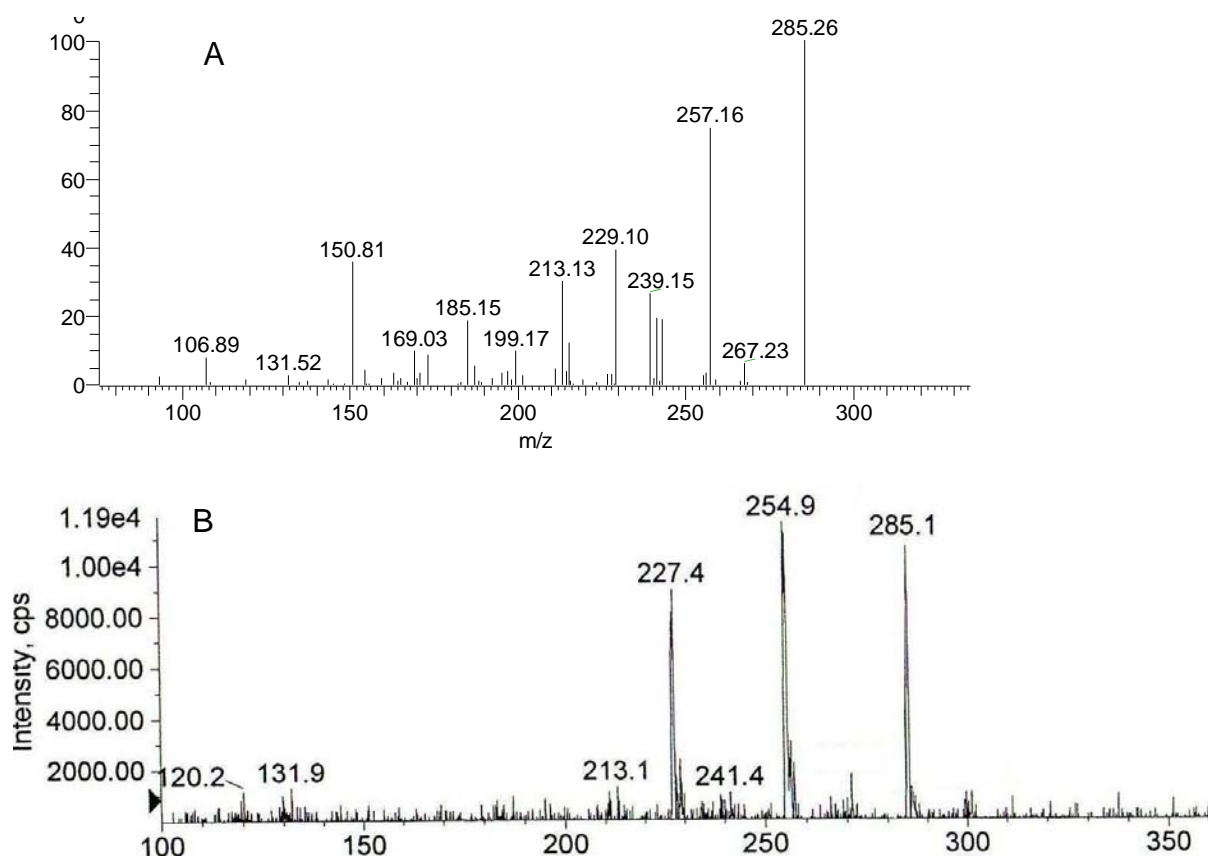


Figure III 67. A. Fragmentation MS/MS de l'ion  $m/z$  285  $[M-H]^-$  du témoin kaempférol (ESI<sup>-</sup>, trappe d'ion, MeOH). B. Fragmentation MS/MS de l'ion  $m/z$  285  $[M-H]^-$  du composé M (ESI<sup>-</sup>, triple quadripôle, MeOH).

Tableau III 2. Récapitulatif comparatif des ions obtenus en ESI<sup>-</sup>-MS/MS par la fragmentation de  $[M-H]^-$  des composés L et M et des témoins quercétine et kaempférol.

	Témoin quercétine	Composé L	Témoin kaempférol	Composé M
Type de spectromètre utilisé	Trappe d'ion	Triple quadripôle	Trappe d'ion	Triple quadripôle
	$m/z$		$m/z$	
$[M-H]^-$	301	301	285	285
$[M-H-CO]^-$	273	-	257	-
$[M-H-CH_2O]^-$	-	271	-	255
$[M-H-CO_2]^-$	257	-	241	241
$[M-H-H_2O-CO]^-$	-	255	-	-
$[M-H-2CO]^-$	-	-	229	-
$[M-H-CH_2O-CO]^-$	-	243	-	227
$[M-H-CO_2-CO]^-$	229	-	213	213
$[M-H-H_2O-2CO]^-$	-	227	-	-
$[M-H-C_2H_2O-CO_2]^-$	-	-	199	-
$[M-H-cycle B]^-$	193	-	-	-
$^{1,2}A^-$	179	179	-	-
$^{1,3}A^-$	151	151	151	151
$^{1,2}A^-CO-CO_2$	107	-	-	-

Nous retrouvons pour les composés **L** et **M** les fragmentations des témoins quercétine et kaempférol respectivement (avec notamment les ions caractéristiques  $^{1,2}A^-$  et  $^{1,3}A^-$ ). Cependant des différences de 2 unités sont observables pour certains ions (en grisé dans le tableau III 2). Cela peut s'expliquer par le fait que les spectres des témoins et des composés **L** et **M** ont été enregistrés sur des spectromètres de

masse différents : la quercétine et le kaempférol ont été fragmentés sur un appareil muni d'une trappe d'ions (« *ion trap* ») alors que **L** et **M** ont été fragmentés sur un appareil à triple quadripôle [de Rijke *et al.*, 2006].

Nous avons donc identifié **L** comme étant la génine flavonol quercétine et **M** comme étant la génine flavonol kaempférol.

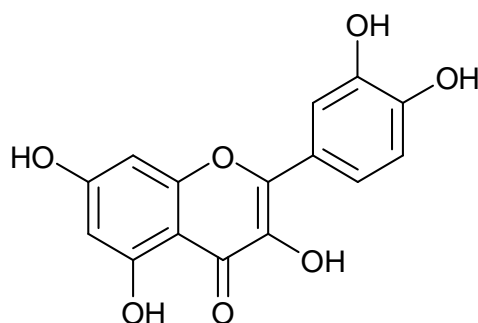


Figure III 68. Structure de la quercétine (composé L)

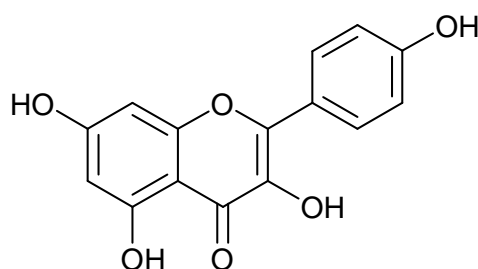


Figure III 69. Structure du kaempférol (composé M)



#### 4.4. Détermination de structure du composé N.

Le composé **N** est le composant majoritaire de la fraction F3.6.2 issue du fractionnement de l'extrait **ECC F<sub>3</sub>**. Il présente une fluorescence bleue en observation à 366 nm après révélation avec le réactif de Neu suggérant la présence d'un acide phénolique. Elué en CCM aux côtés de divers témoins d'acides phénoliques (acide caféique, acide chlorogénique, acide coumarinique et acide férulique) : il montre le même *R<sub>f</sub>* que l'acide chlorogénique.

Nous avons choisi de tenter une identification de ce composé par LC-UV(DAD)-MS sans isolement préalable (identification dite « *on line* »). Les conditions chromatographiques employées sont décrites au chapitre V.

Le profil du spectre UV du composé **N** montre des maxima d'absorption à 222 et 216 nm avec un épaulement à 290 nm ce qui correspond aux données décrites dans la littérature pour les dérivés d'acide caféique [Clifford, 2003]. Le spectre de masse en ionisation APCI réalisé sur un spectromètre muni d'une trappe d'ion (« *ion trap* ») du composé **N** est présenté figure III 71.

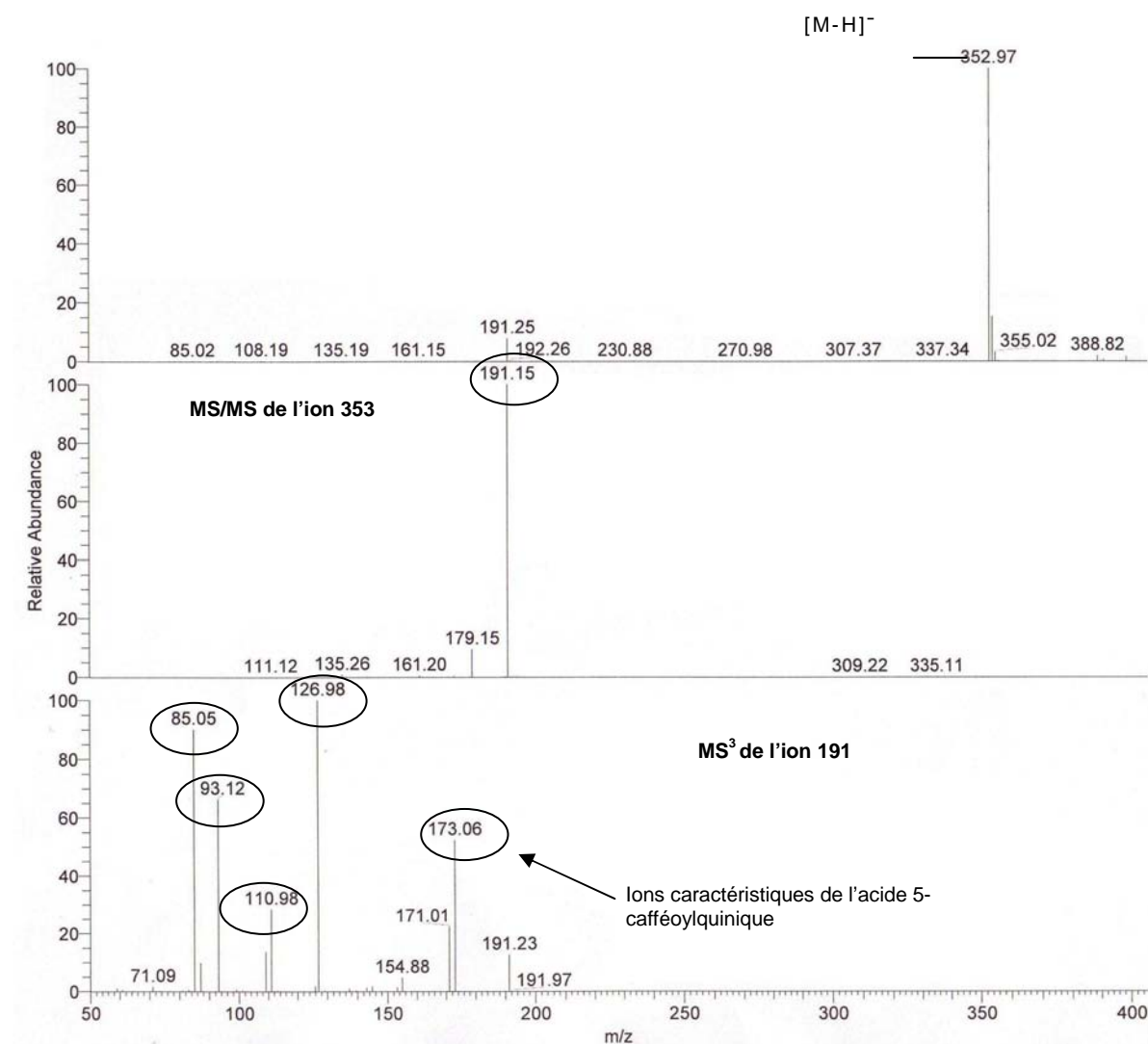


Figure III 70. Spectre de masse du composé **N** et spectres MS/MS et MS<sup>3</sup> (APCI<sup>-</sup>)

Le composé **N** a une masse de 354 u comme l'atteste, sur le spectre en APCI<sup>-</sup>, la présence de l'ion à  $m/z$  353 [M-H]<sup>-</sup>. Cette masse peut correspondre à quatre acides caféoylquiniques : l'acide 1-*O*-caféoylquinique, l'acide 3-*O*-caféoylquinique, l'acide 4-*O*-caféoylquinique et l'acide 5-*O*-caféoylquinique (numérotation IUPAC [IUPAC, 1976]). Les fragmentations en masse de ces quatre isomères ont été décrites par Clifford *et al.* (dans les mêmes conditions, ionisation APCI<sup>-</sup> et analyseur *ion trap*) :

- l'acide 3-*O*-caféoylquinique présente un pic de base en MS<sup>2</sup> à  $m/z$  191 et un pic à  $m/z$  179 relativement intense (environ 50 % du pic de base) ;
- l'acide 4-*O*-caféoylquinique présente un pic de base en MS<sup>2</sup> à  $m/z$  173 ;
- les acides 1-*O*-caféoylquinique et 5-*O*-caféoylquinique présentent les mêmes spectres MS<sup>2</sup> à savoir un pic de base à  $m/z$  191 et un ion très faible à indétectable (>5 % du pic de base) à  $m/z$  179 et sont différenciables par leur temps de rétention [Clifford *et al.*, 2005].

Ainsi, la description des spectres des acides 1-*O*-caféoylquinique et 5-*O*-caféoylquinique correspond à celle du composé **N**. La coélution de ce composé avec le témoin acide 5-*O*-caféoylquinique ou acide chlorogénique en LC-MS nous permet de l'identifier comme étant l'acide chlorogénique [Clifford, 2003 ; Clifford *et al.*, 2005].

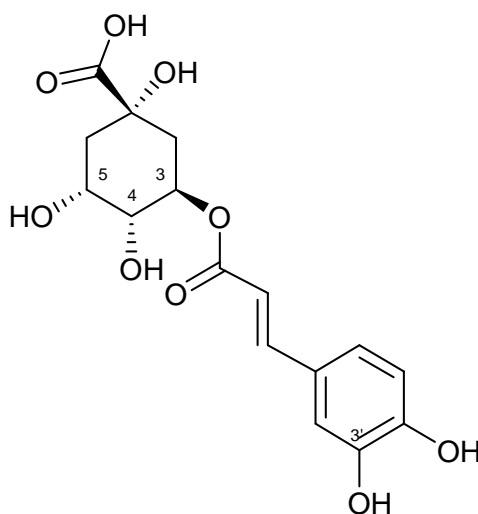


Figure III 71. Structure de l'acide chlorogénique (composé N).

## 4.5. Détermination de structure des composés O à R isolés des sous-fractions polaires de ECC F3.

### 4.5.1. Détermination de structure du composé O

Le composé **O** se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Ce composé réagit avec le réactif de Neu en présentant une fluorescence jaune sous UV à 365 nm laissant envisager une structure de type flavonoïde.

#### Spectrométrie de masse.

La masse moléculaire de 448 u a été déterminée par l'examen du spectre de masse en ESI<sup>-</sup> du composé **O** qui présentait un ion *quasi*-moléculaire à  $m/z$  447 [M-H]<sup>-</sup>. De plus, le fragment à  $m/z$  301 [M-H-146]<sup>-</sup> démontre la perte d'une unité désoxyhexose et la fragmentation peut correspondre à une génine de type quercétine (figure III 73). En effet, nous observons la présence des ions caractéristiques de cette génine (cf. tableau III 2). De plus la présence de l'ion Y<sub>0</sub><sup>-•</sup> conforte l'hypothèse de la présence d'un flavonol et le rapport des abondances relatives entre Y<sub>0</sub><sup>-•</sup> / Y<sub>0</sub><sup>-</sup> d'environ 250 % indique une liaison osidique en position 3 de la génine.

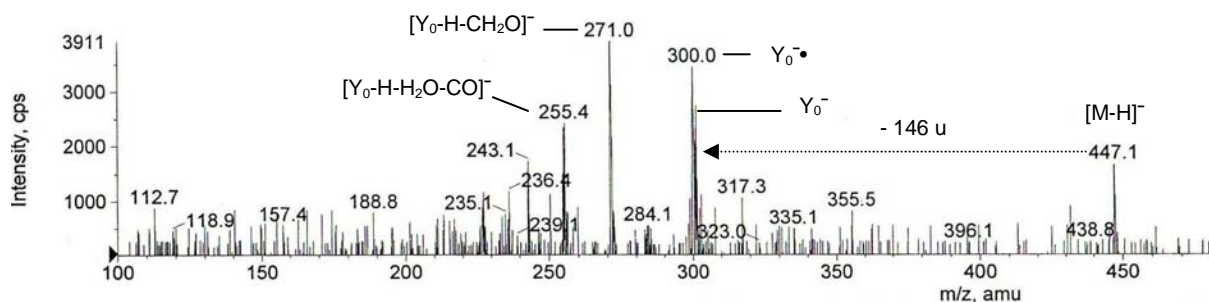


Figure III 72. Spectre de masse ESI<sup>-</sup> du composé **O** (MeOH)

Nous avons réalisé des chromatogrammes HPLC du composé **O** ainsi que du témoin quercitrine : quercétine-3-*O*-rhamnopyranoside (conditions chromatographiques : cf. chapitre v). La coélution du composé **O** avec la quercitrine permet d'envisager qu'il s'agit de la même molécule.

Afin de confirmer les éléments d'identification structurale apportés par la spectrométrie de masse et l'analyse HPLC, notamment la configuration du carbone anomérique nous avons réalisé un spectre de RMN-<sup>1</sup>H du composé **O**.

#### Spectrométrie de RMN.

Le spectre de RMN-<sup>1</sup>H du composé **O** (figure III 74) confirme les informations apportées par la spectrométrie de masse en montrant, entre 6.1 et 7.2 ppm, les signaux de la génine quercétine (cf. détermination structurale des composé **A**, **D** et **E**) ainsi que les signaux caractéristiques d'un rhamnopyranoside : le signal d'un groupement méthyle (H-6'') formant un doublet à  $\delta_H$  0.94 ppm ( $d$ ,  $J$  = 6.0 Hz), deux multiplets à  $\delta_H$  3.35 et 3.40 ppm (respectivement H-5'' et H-4'') et deux signaux

formant des doublets dédoublés à  $\delta_H$  3.75 ppm ( $dd$ ,  $J = 9.1$  Hz,  $J = 3.3$  Hz) pour H-3'' et 4.21 ppm ( $dd$ ,  $J = 3.3$  Hz,  $J = 1.7$  Hz) pour H-2''. Enfin le proton anomérique est observable à  $\delta_H$  5.35 ppm et forme un doublet de constante de couplage  $J = 1.7$  Hz attestant de la configuration  $\alpha$  de la liaison anomérique.

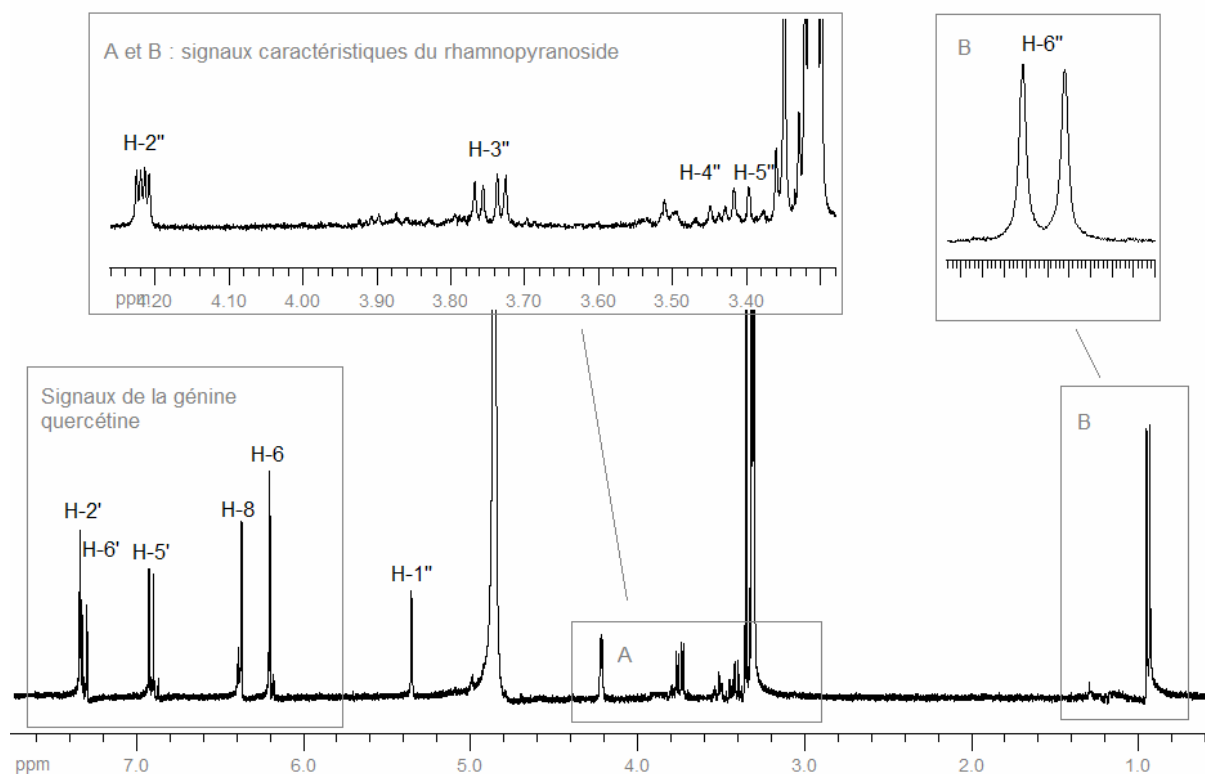


Figure III 73. Spectre de RMN- $^1H$  du composé O dans MeOD.

Ainsi, la présence de la quercétine-3- $O$ - $\alpha$ -rhamnopyranoside, également appelée quercitrine est confirmée dans ECC.

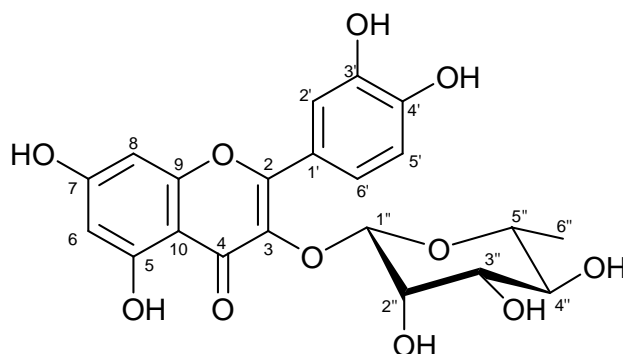


Figure III 74. Structure de la quercétine-3- $O$ - $\alpha$ -rhamnopyranoside (composé O)

### 4.5.2. Détermination de structure du composé P

Le composé **P** se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Ce composé réagit avec le réactif de Neu présentant une fluorescence verte sous UV à 365 nm laissant envisager une structure de type flavonoïde.

#### Spectrométrie de masse.

La masse moléculaire de 418 u a été déterminée par le spectre de masse en ESI<sup>-</sup> du composé **P** qui présentait un ion *quasi*-moléculaire à  $m/z$  417 [M-H]<sup>-</sup>. De plus, le fragment à  $m/z$  285 [M-H-132]<sup>-</sup> démontre la perte d'une unité pentose et peut correspondre à une génine de type kaempférol (figure III 76).

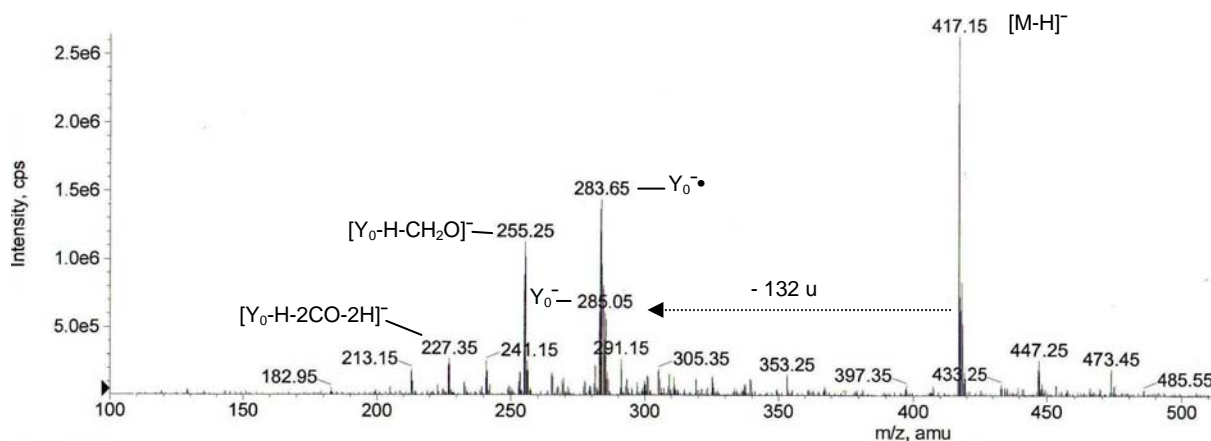


Figure III 75. Spectre de masse du composé P (ESI<sup>-</sup>, MeOH)

#### Spectrométrie de RMN.

En raison de la très faible quantité de produit obtenue (< 2 mg), les spectres de RMN du composé **P** ont été enregistrés sur un appareil fonctionnant à une fréquence de 500 MHz équipé d'une cryosonde permettant d'obtenir un très bon rapport signal/bruit et d'améliorer la résolution.

L'analyse du spectre de RMN-<sup>1</sup>H du composé **P** a confirmé la présence des signaux des protons de la génine kaempférol ainsi que la présence du signal du proton anomérique d'un sucre à  $\delta_H$  5.15 ppm ( $d$ ,  $J = 6.4$  Hz).

Les déplacements des autres protons de ce sucre sont caractéristiques d'un arabinose ( $\delta_H$  3.91, 3.65, 3.81, 3.43 et 3.78 pour, respectivement, H-2'', H-3'', H-4'' et les deux protons H-5'') [Agrawal, 1992]. De plus, la constante de couplage entre H-2'' et H-3'' de  $J = 8.2$  Hz indique une configuration *trans*-diaxiale, alors que la constante de couplage entre H-3'' et H-4'' ( $J = 3.2$  Hz) implique une orientation *axial-equatorial*, c'est-à-dire la configuration d'un arabinopyranose (figure III 77).

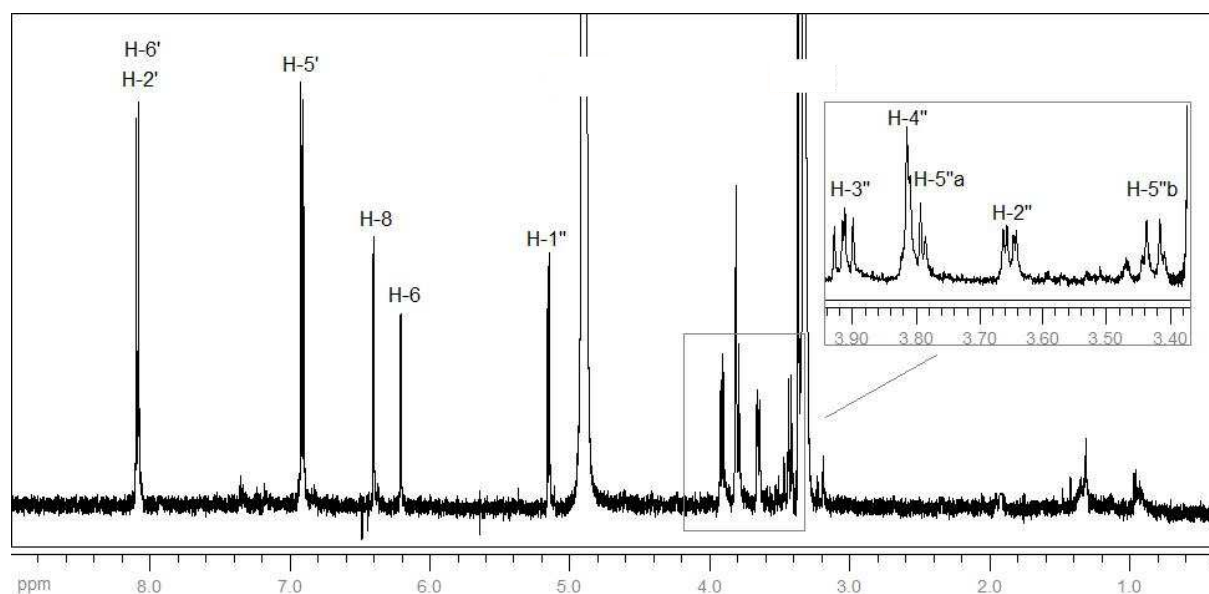


Figure III 76. Spectre de RMN- $^1\text{H}$  du composé **P** dans MeOD.

L'analyse des 20 signaux du spectre de RMN- $^{13}\text{C}$  du composé **P** a indiqué dans l'ensemble une forte similitude avec celui du composé **F** (kaempférol-3-*O*-rutinoside), à l'exception de la région des signaux des sucres. Les signaux en dehors de cette région ont confirmé que la génine du composé **P** est à nouveau du kaempférol [Ternai et Markham, 1976]. Les signaux de RMN- $^{13}\text{C}$  de la région des sucres sont caractéristiques d'un arabinose ( $\delta_{\text{C}}$  71.3, 72.6, 67.6 et 65.4 ppm pour respectivement C-2'', C-3'', C-4'' et C-5'') [Agrawal, 1992].

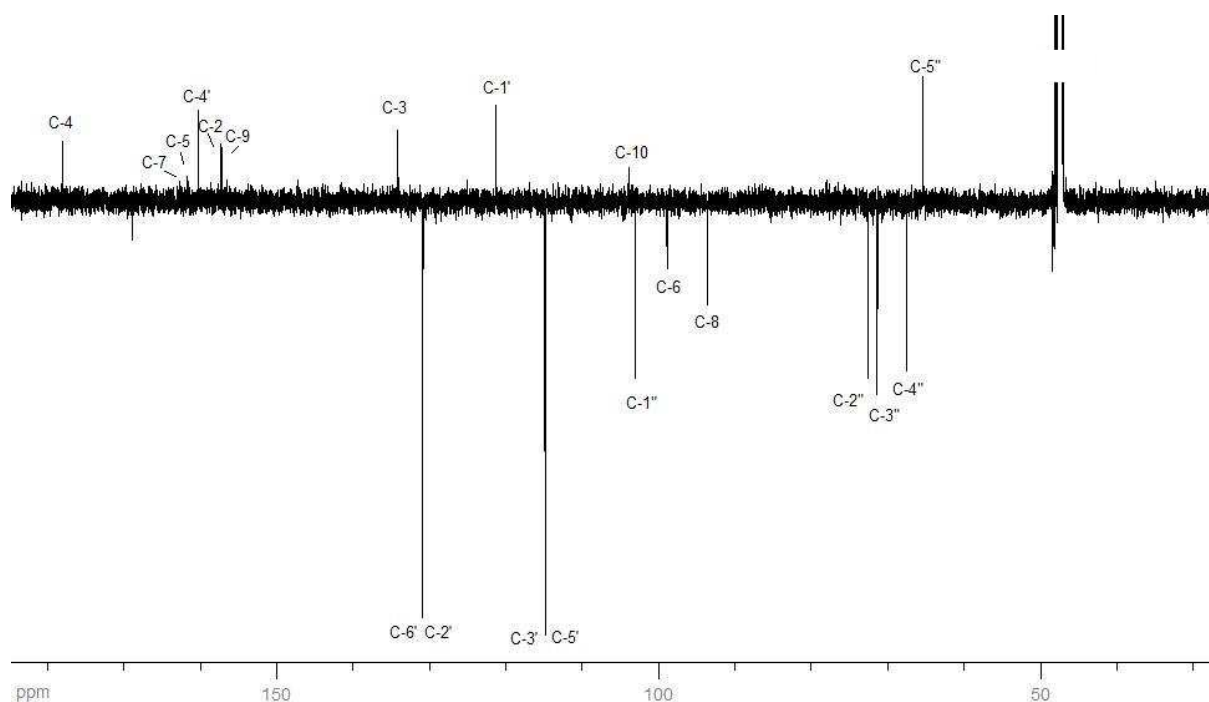


Figure III 77. Spectre de RMN- $^{13}\text{C}$  du composé **P** dans MeOD.

La forme pyranose est confirmée par le déplacement chimique du carbone C-4'' ( $\delta_C$  67.6 ppm contre  $\sim 85$  ppm dans le cas d'une forme furanose) [Agrawal, 1992].

Le doublet de constante de couplage  $J = 6.4$  Hz formé par le proton anomérique ( $\delta_C$  103.0 /  $\delta_H$  5.15 ppm) indique une orientation en *axial* du proton et de ce fait une liaison en  $\beta$  avec la génine.

L'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse des spectres de corrélations homonucléaires COSY et hétéronucléaires HSQC et HMBC et par comparaison avec des données de la littérature. Le spectre HMBC a, en outre, permis de situer la liaison du sucre sur la génine en montrant clairement le couplage du proton anomérique du pentose (H-1'') avec le carbone C-3 de la génine.

Le composé **P** est donc identifié comme étant le kaempférol-3-*O*- $\beta$ -arabinopyranoside.

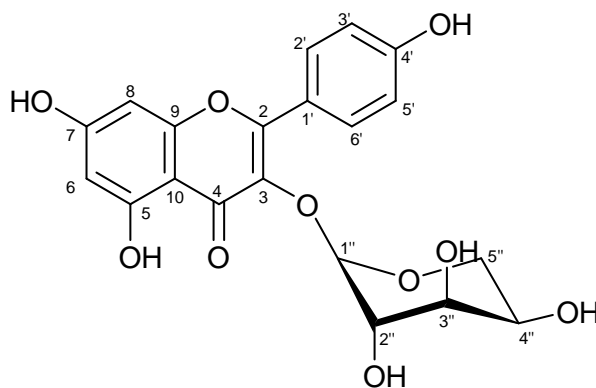


Figure III 78. Structure du kaempférol-3-*O*- $\beta$ -arabinopyranoside (composé P).

### 4.5.3. Détermination de structure du composé Q

Le composé **Q** se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Ce composé réagit avec le réactif de Neu présentant une fluorescence verte sous UV à 365 nm laissant envisager une structure de type flavonoïde.

#### Spectrométrie de masse.

Les ions présents sur les spectres de masse en ESI des composés **P** et **Q** sont absolument identiques, seules diffèrent les intensités relatives des différents ions (figure III 80). La spectrométrie de masse nous permet donc à nouveau d'envisager pour **Q** une structure du type kaempférol-*O*-pentose, isomère du composé **P**.

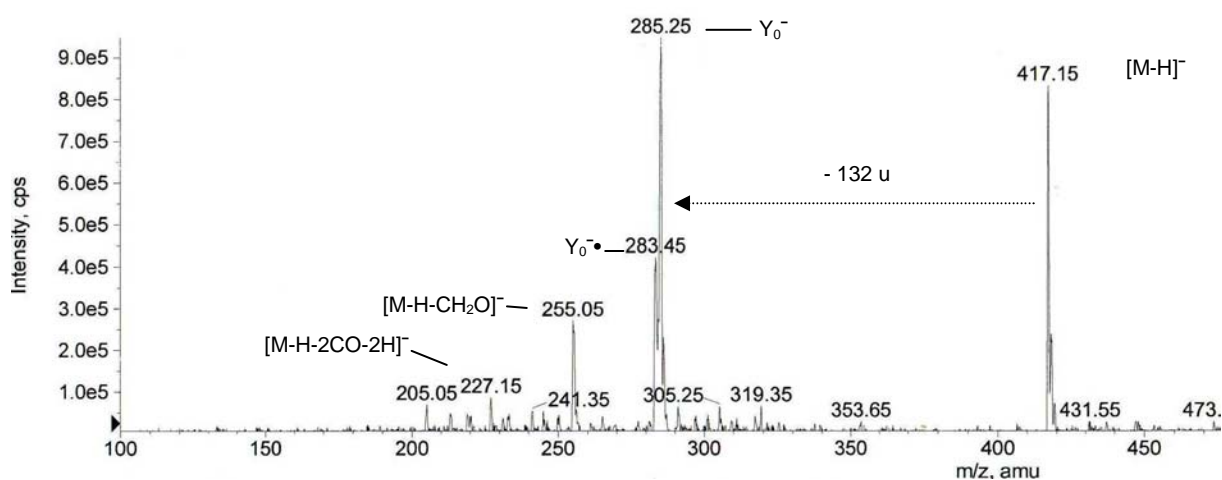


Figure III 79. Spectre de masse du composé **Q** (ESI<sup>-</sup>, MeOH)

#### Spectrométrie de RMN.

Pour **Q** et **R**, comme précédemment pour le composé **P**, les spectres RMN ont été obtenus sur un appareil fonctionnant à une fréquence de 500 MHz équipé d'une cryosonde pour améliorer le signal.

L'analyse du spectre de RMN-<sup>13</sup>C (figure III 81) a indiqué dans l'ensemble une forte similitude avec celui du composé **P**, à l'exception de la région des signaux des sucres. Les signaux en dehors de cette région ont confirmé que la génine du composé **N** est à nouveau du kaempférol.

Les signaux RMN-<sup>13</sup>C et RMN-<sup>1</sup>H de la région des sucres sont absolument identiques à ceux du composé **B** (quercétine-3-*O*- $\alpha$ -arabinofuranoside).



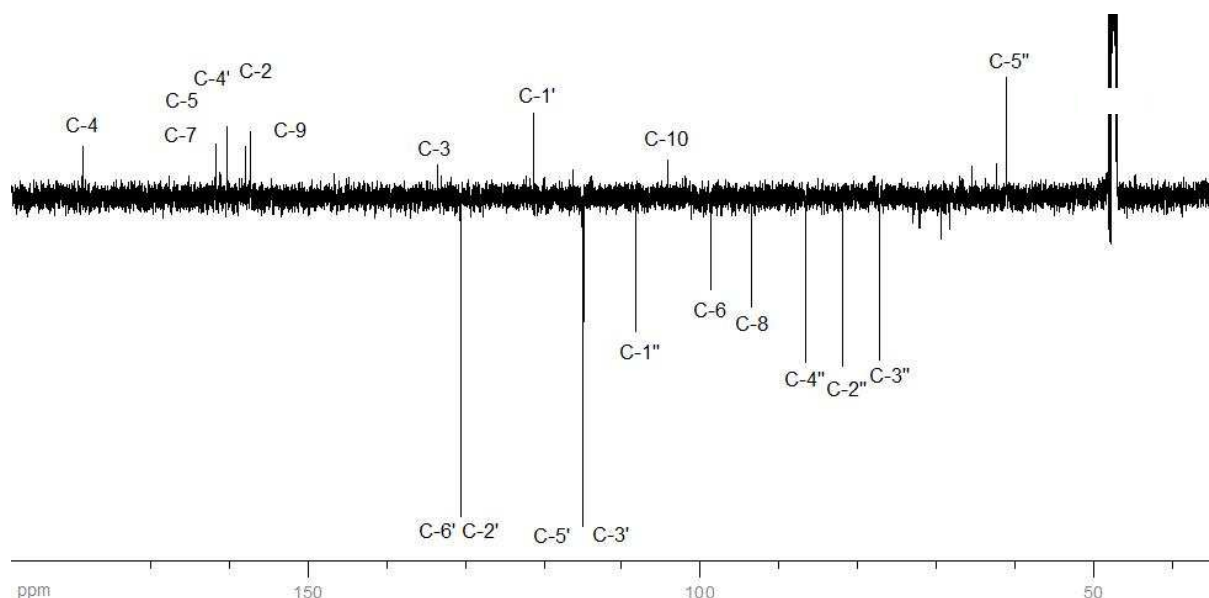


Figure III 80. Spectre de RMN- $^{13}\text{C}$  du composé **Q** dans MeOD.

Le signal du proton anomérique apparaît comme un doublet de constante  $J = 0.4$  Hz, impliquant une anomérie de configuration  $\alpha$ .

L'attribution complète des signaux carbones et protons a été réalisée à l'aide des spectres HSQC et HMBC et l'ensemble de ces données nous permet d'établir la structure de **Q** comme étant le kaempférol-3-*O*- $\alpha$ -arabinofuranoside ou euglanine.

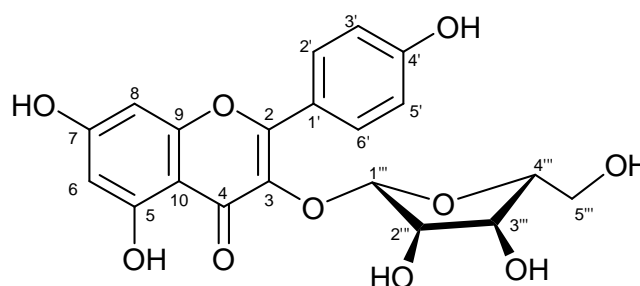


Figure III 81. Structure du kaempférol-3-*O*- $\alpha$ -arabinofuranoside (composé **Q**).

#### 4.5.4. Détermination de structure du composé R

Le composé **R** se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Ce composé réagit avec le réactif de Neu en présentant une fluorescence verte sous UV à 365 nm laissant envisager une structure de type flavonoïde.

##### Spectrométrie de masse.

La masse moléculaire de 432 u a été déterminée par le spectre de masse en ESI<sup>-</sup> qui présentait un ion *quasi*-moléculaire à  $m/z$  431 [M-H]<sup>-</sup>. De plus, le fragment le plus abondant à  $m/z$  285 [M-H-146]<sup>-</sup> démontre la perte d'une unité désoxyhexose et suppose la présence d'une génine kaempférol (figure III 83).

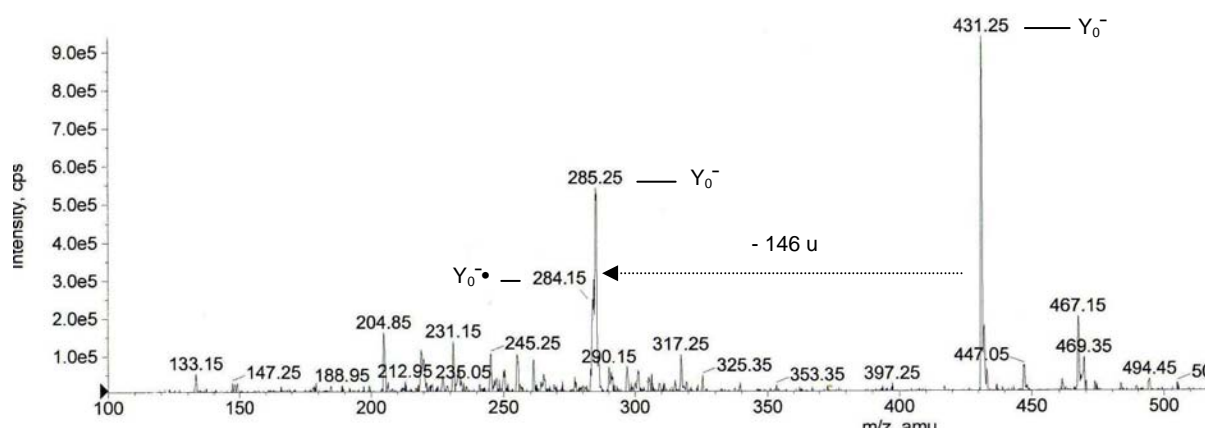


Figure III 82. Spectre de masse du composé R (ESI<sup>-</sup>, MeOH)

##### Spectrométrie de RMN.

Sur le spectre de RMN-<sup>1</sup>H du composé **R** (figure III 84), nous retrouvons, comme dans le cas des composés **Q** et **P**, les signaux caractéristiques de la génine kaempférol. Le signal du proton anomérique du sucre est également visible à  $\delta_H$  5.40 ppm.

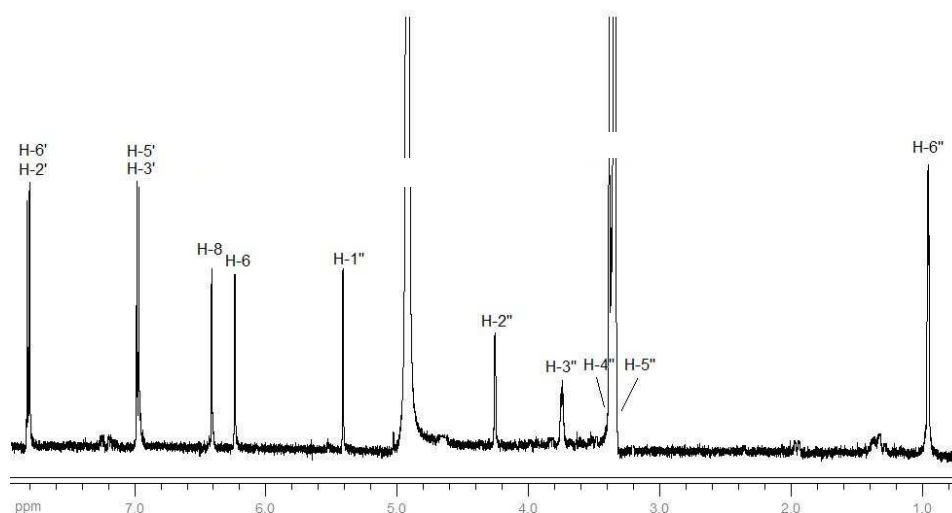


Figure III 83. Spectre de RMN-<sup>1</sup>H du composé R dans MeOD.

Comme dans le cas du composé **P**, les signaux du sucre sont caractéristiques d'un rhamnopyranoside dont la liaison anomérique est en position  $\alpha$  (constante de couplage entre H-1'' et H-2'' de  $J = 1.6$  Hz).

Les 20 signaux RMN- $^{13}\text{C}$  du spectre du composé **R** (figure III 85) confirment que nous sommes en présence des signaux caractéristiques d'une génine kaempférol et d'un rhamnopyranoside. Ces deux éléments sont liés par une liaison osidique en position 3 de la génine comme l'atteste la corrélation sur le spectre HMBC de **R** entre le proton anomérique H-1'' et la carbone C-3.

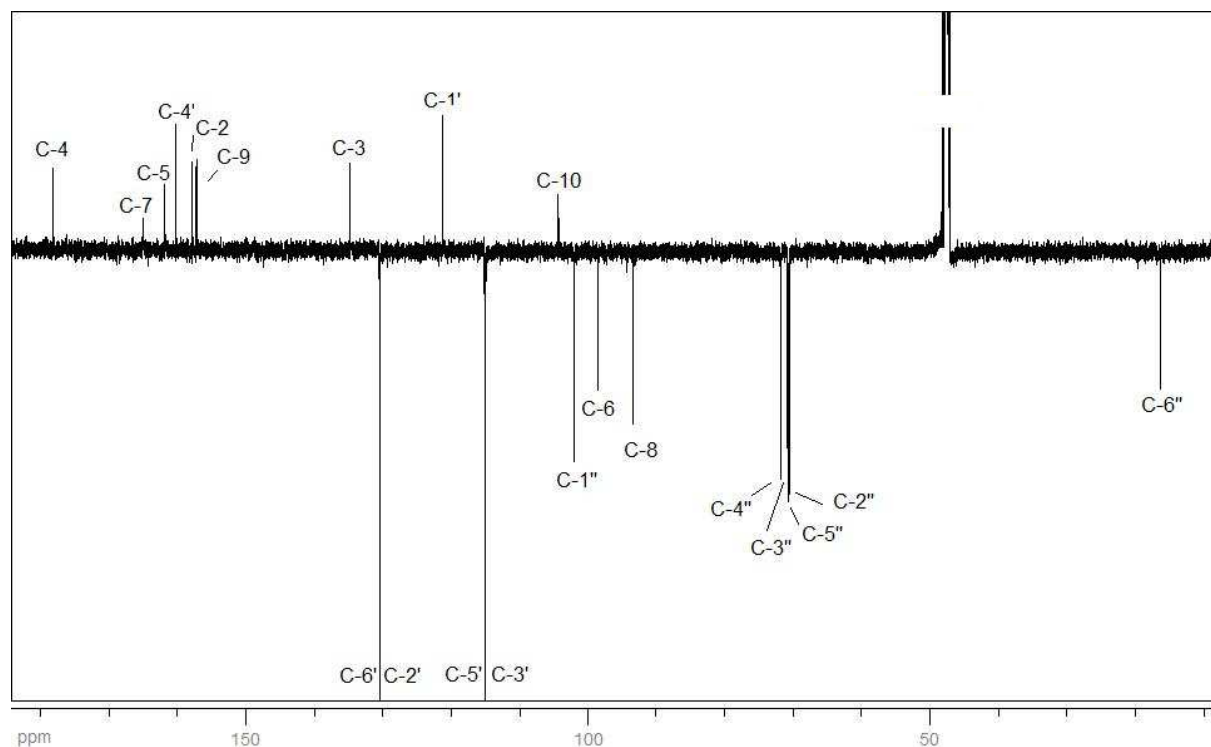


Figure III 84. Spectre de RMN- $^{13}\text{C}$  du composé **R** dans MeOD.

L'ensemble de ces données nous permet d'établir la structure de **R** comme étant le kaempférol-3- $O$ - $\alpha$ -rhamnopyranoside, également appelé afzéline.

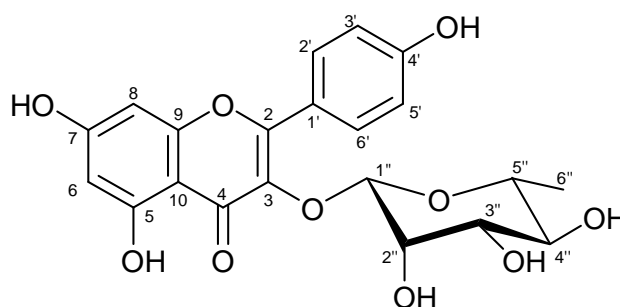


Figure III 85. Structure du kaempférol-3- $O$ - $\alpha$ -rhamnopyranoside (composé **R**).

#### 4.6. Conclusion de l'étude phytochimique de *Embelia concinna*

L'étude phytochimique de l'extrait **F<sub>3</sub>** de *Embelia concinna* a permis de renforcer la connaissance phytochimique de cette plante. Dix composés ont été identifiés dans cet extrait : taraxérol (**I**), 5-(8'(Z),11'(Z),14'(Z)-heptadécatrienyl)résorcinol (**J**), acide linolénique (**K**), quercétine (**L**), kaempférol (**M**), acide chlorogénique (**N**), quercitrine (**O**), kaempférol-3-*O*- $\beta$ -arabinopyranoside (**P**), euglanine (**Q**) et afzéline (**R**).

La présence des génines libres quercétine et kaempférol dans l'extrait **ECC F<sub>3</sub>** est en accord avec l'identification des flavonoïdes glycosylés de cet extrait dont les génines sont soit la quercétine soit le kaempférol.

Le composé **J** peut être utilisé comme traceur spécifique puisqu'il n'a, à notre connaissance, été décrit dans aucune espèce de la famille des *Myrsinaceae*.

Les traceurs flavonoïdiques dont certains sont disponibles commercialement (composés **L**, **M**, **N** et **O**) seront préférés pour les dosages de l'extrait.

## **IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

La flore malgache est l'une des plus riches au monde et possède de nombreuses plantes utilisées en médecine traditionnelle. Parmi elles, quatre plantes ont fait l'objet d'une étude phytochimique approfondie.

Cette étude s'inscrit dans le cadre des travaux de recherche de l'équipe Recherche et Développement de Serdex, division de Bayer Consumer Care. L'objectif était l'identification de molécules, le développement de techniques analytiques destinées à optimiser la recherche sur ces plantes et la mise en évidence de différents traceurs spécifiques en vue du dosage des extraits de ces plantes.

En effet, la détermination de la composition chimique d'un extrait végétal, la mise en évidence d'éventuelles spécificités et le contrôle de sa qualité sont des étapes préalables cruciales au développement et à la commercialisation de cet extrait qui nécessitent la mise en place de méthodes d'analyse spécifiques.

Nous avons présenté les résultats de l'étude phytochimique des quatre plantes *Agauria salicifolia* Hook.f. ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker, *Tambourissa trichophylla* Baker et *Embelia concinna* Baker.

***Agauria salicifolia* et *Agauria polyphylla*.** La mise en place de techniques chromatographiques classiques de fractionnement des extraits de feuilles de *Agauria salicifolia* Hook.f. ex Oliver et *Agauria polyphylla* Baker a conduit à l'isolement et l'identification d'un flavonol de *Agauria salicifolia* : la quercétine-3-*O*-glucuronide (miquélianine (**D**)) ainsi que de trois molécules de *Agauria polyphylla* : deux flavonoïdes, la quercétine-3-*O*-arabinofuranoside (avicularine (**A**)) et l'épicatéchine (**B**) et un triterpène pentacyclique, le lupéol (**C**).

Cette première étape a permis de mettre en évidence la présence de proanthocyanidols dans ces espèces du genre *Agauria*. Ces espèces ont d'ailleurs été étudiées en parallèle en raison de leur grande parenté. Nous avons réalisé une étude comparative par LC-MS de la composition des fractions flavonoïdiques de *Agauria salicifolia* et *Agauria polyphylla*. Cela a abouti à l'identification « *on line* » c'est-à-dire sans isolement préalable de 8 composés de type flavonols glycosylés : la quercétine-3-*O*-galactoside (hypéroside), la quercétine-3-*O*-glucoside (isoquercitrine), la quercétine-3-*O*-rhamnoside (quercitroside), la génine quercétine, le kaempférol-3-*O*-arabinopyranoside, le kaempférol-3-*O*-arabinofuranoside, le kaempférol-3-*O*-rhamnoside (afzéline) et le kaempférol-3-*O*-glucuronide.

Cette étude démontre l'efficacité de la technique d'analyse que sont la LC-MS et la LC-MS<sup>n</sup>. Dans ce cas précis où les techniques chromatographiques n'avaient donné que peu de résultats, la LC-MS appliquée aux flavonoïdes a permis d'identifier plus rapidement un nombre beaucoup plus important de composés sans avoir à les isoler. Ceci est un bon exemple de *dereplication*, procédure utilisée en phytochimie pour éviter de ré-isoler des composés connus.

Nous avons également mis en évidence des différences phytochimiques entre ces deux espèces : en effet, la miquélianine et le kaempférol-3-*O*-glucuronide, deux flavonols à substituants acide glucuronique ne sont présents que dans *Agauria salicifolia*.

Ce résultat est important car il apporte un élément de réponse supplémentaire au problème taxonomique de la différenciation de ces deux espèces. Comme nous l'avons montré au chapitre II, il est difficile de différencier ces deux espèces sur le plan botanique. Elles sont morphologiquement proches et *Agauria salicifolia* est décrite comme étant polymorphe, *Agauria polyphylla* pourrait ne pas être une espèce à part entière mais seulement une des formes de *Agauria salicifolia*. Dans l'optique d'un développement industriel des extraits d'*Agauria polyphylla*, la spectrométrie de masse apporte une solution simple et fiable à ce problème de différenciation. La distinction entre ces espèces, basée des molécules spécifiques et surtout sur un type de substituant spécifique à *Agauria salicifolia* permet d'envisager la mise en place de techniques d'analyse différentielles par spectrométrie de masse en infusion directe de l'extrait flavonoïdique. En s'affranchissant de la séparation par HPLC, l'analyse devient plus simple et plus rapide et ne consiste plus qu'en la détection d'une perte de neutre correspondant au glucuronide dans l'extrait. *Agauria salicifolia* et *Agauria polyphylla* n'ayant pas démontré les mêmes activités biologiques ni même la même toxicité (*Agauria salicifolia* semble plus toxique), cette technique d'analyse, un fois validée, permettra d'authentifier l'origine d'un extrait et même de déceler d'éventuelles falsifications d'*Agauria polyphylla* par *Agauria salicifolia*.

En vue de l'utilisation en cosmétique de l'espèce *A. polyphylla*, il serait également nécessaire de pouvoir certifier l'absence des composés diterpéniques de type grayanotoxines (décrits dans le genre *Agauria*) dans les extraits d'intérêt. Pour cela, une recherche plus ciblée de ces composés dans les extraits de *A. salicifolia* et *A. polyphylla* devrait être entreprise et une méthode d'analyse spécifique devrait être mise en place.

**Tambourissa trichophylla.** L'analyse des extraits des feuilles de l'espèce *Tambourissa trichophylla* Baker a elle aussi été rendue difficile par la présence de composés de type proanthocyanidols. La technique qui s'est avérée être la plus efficace dans ce cas pour isoler et identifier des composés flavonoïdiques pour servir de traceurs est la chromatographie de partage centrifuge. A ce stade, trois molécules dont l'association est spécifique de *Tambourissa trichophylla* ont été identifiées et sélectionnées pour servir de traceurs pour l'extrait pilote industriel mis en place par Serdex : la rutine (**E**), la nicotiflorine (**F**) et l'isoquercitrine (**H**). La méthode d'analyse de cet extrait par HPLC reste à valider.

Malgré les résultats des études phytochimiques antérieures attestant de la présence d'alcaloïdes dans de nombreuses *Monimiaceae*, aucun composé de cette classe n'a été détecté ou isolé lors de ce travail.

Dans une optique de valorisation de la ressource végétale, les huiles essentielles de feuilles et d'écorce de *Tambourissa trichophylla* vont être étudiées car elles ont donné des résultats prometteurs contre *Plasmodium falciparum*, agent responsable du paludisme. L'analyse de ces huiles essentielles par GC-MS est en cours et les résultats chimiques et biologiques devraient donner lieu à une publication scientifique.

**Embelia concinna.** Dix composés (**I** à **R**) ont été isolés des extraits de feuilles d'*Embelia concinna*. Tous sont décrits pour la première fois dans cette espèce. Le taraxérol (**I**), le 5-(8'(Z),11'(Z),14'(Z)-heptadécatrienyl)résorcinol (**J**), l'acide linolénique (**K**), le kaempférol-3-*O*- $\beta$ -arabinopyranoside (**P**), l'euglanine (**Q**) et l'afzéline (**R**) ont été isolés et identifiés par des techniques chromatographiques et spectrales classiques (RMN 1D et 2D). Les quatre autres molécules, la quercétine (**L**), le kaempférol (**M**), l'acide chlorogénique (**N**) et la quercitrine (**O**) ont été identifiés uniquement sur la base de leur comportement en LC-MS et en spectrométrie de masse. L'identification par RMN du composé **O** a permis de confirmer l'identification faite par spectrométrie de masse et de montrer une fois de plus l'efficacité de cette technique appliquée à l'identification des flavonoïdes. Cette technique permet donc d'avoir accès rapidement à l'identification d'un certain nombre de molécules pouvant servir « d'empreinte chimique » pour un extrait de plante donné.

Aucune benzoquinone, pourtant largement décrites dans le genre *Embelia*, n'a été isolée ni détectée dans l'espèce *Embelia concinna*, ce qui pourrait expliquer son absence de toxicité. Ces composés, ainsi que les alkylrésorcinols auxquels appartient le composé **J**, sont connus pour être cytotoxique et présenter une large gamme d'activités biologiques notamment en tant qu'antimicrobiens et antiparasitaires [Kozubek et Tyman, 1999]. Il serait donc extrêmement intéressant de déterminer si ces composés sont les principes actifs d'*Embelia concinna* et de les rechercher de façon plus ciblée dans cette espèce.

De façon générale, il sera nécessaire, à la suite de cette étude, de chercher à déterminer les molécules responsables des activités des plantes *Agauria polyphylla*, *Tambourissa trichophylla* et *Embelia concinna*. Pour cela, des méthodes in vitro rapides de détermination des activités seront à mettre au point, tout d'abord pour tester les molécules déjà isolées, puis, pour être utilisées en vue d'un fractionnement bioguidé.

Cette étude a permis de mieux connaître la chimie de quelques plantes tropicales malgaches. Seule une faible partie des 10 à 12 000 espèces de la flore malgache a été caractérisée du point de vue phytochimique. Les sujets d'étude dans ce domaine ne manquent donc pas et chaque plante est un réservoir potentiel de métabolites avec des caractéristiques phytochimiques et pharmacochimiques originales à valoriser.



## **V. MATERIELS ET METHODES**

## 1. Matériel végétal et extraction

Les 4 plantes de cette étude, *Agauria salicifolia*, *Agauria polyphylla*, *Embelia concinna*, *Tambourissa trychophylla* ont été récoltées à Madagascar en 2004 dans les forêts secondaires d'altitudes de la région de Muramanga. Ces plantes ont été identifiées par un botaniste malgache, M. Hery et des échantillons de référence se trouvent dans l'herbier du laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse (sous les références, respectivement, ASA 0403, APY 0403, ECC 0403 et TTI 0403).

Les drogues ont été séchées et broyées avant d'être extraites par la société Sotramex à Madagascar suivant le processus décrit figure V 1. La drogue est extraite par macération agitée à l'éthanol à 70 % à 50 °C. L'extrait éthanolique obtenu, appelé **F<sub>1</sub>**, est ensuite dégraissé à l'hexane par extraction liquide-liquide. La fraction hexanique obtenue est appelée **F<sub>2</sub>**. L'extrait éthanolique dégraissé est évaporé à siccité puis le résidu, solubilisé dans l'eau, est partagé par extraction liquide-liquide entre l'acétate d'éthyle et l'eau. L'extrait acétate d'éthyle est appelé **F<sub>3</sub>** et l'extrait aqueux résiduel est appelé **F<sub>4</sub>**.

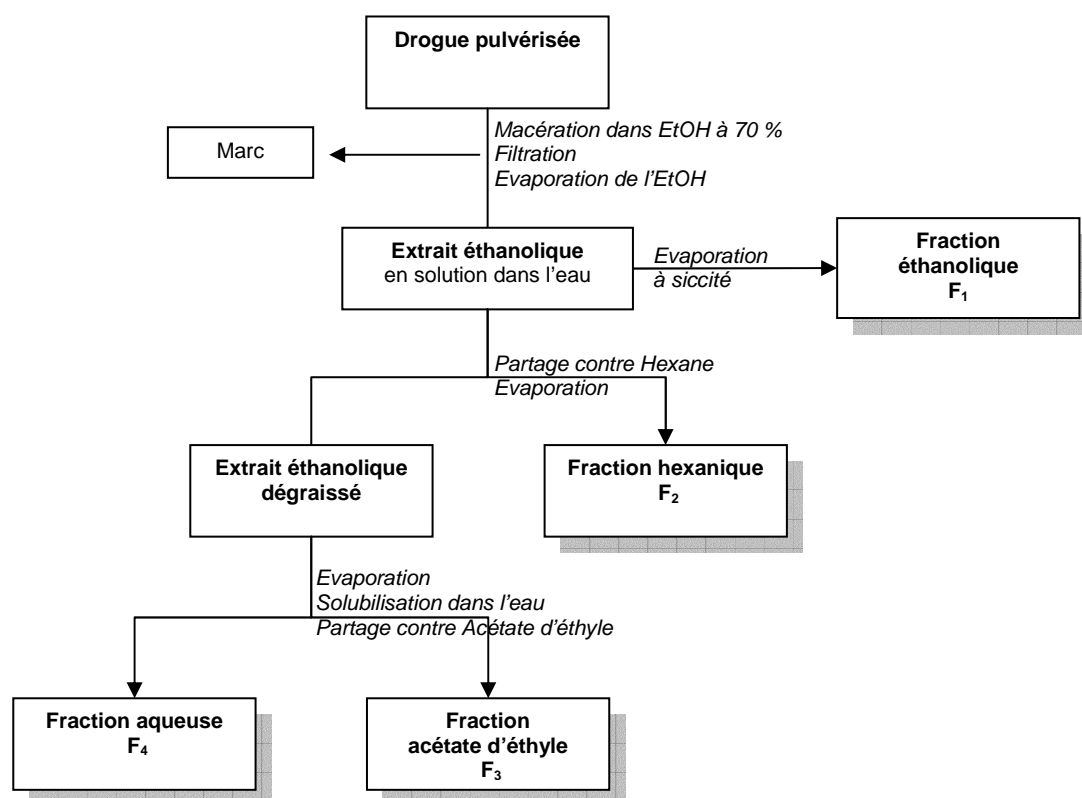


Figure V 1. Schéma d'extraction des plantes de cette étude et obtention des fractions **F<sub>1</sub>** à **F<sub>4</sub>**.

Pour cette étude, nous disposons pour chacune des plantes des fractions **F<sub>1</sub>** à **F<sub>4</sub>** et d'environ 1 kg de feuilles sèches.

Tableau IV 1. Quantités d'extraits disponibles.

<b>APY F<sub>1</sub></b>	48.7 g	<b>ASA F<sub>1</sub></b>	43.6 g	<b>TTI F<sub>1</sub></b>	64.0 g	<b>ECC F<sub>1</sub></b>	37.6 g
<b>APY F<sub>2</sub></b>	11.7 g	<b>ASA F<sub>2</sub></b>	4.5 g	<b>TTI F<sub>2</sub></b>	4.6 g	<b>ECC F<sub>2</sub></b>	5.4 g
<b>APY F<sub>3</sub></b>	12.8 g	<b>ASA F<sub>3</sub></b>	17.5 g	<b>TTI F<sub>3</sub></b>	24.5 g	<b>ECC F<sub>3</sub></b>	7.3 g
<b>APY F<sub>4</sub></b>	64.2 g	<b>ASA F<sub>4</sub></b>	52.9 g	<b>TTI F<sub>4</sub></b>	48.9 g	<b>ECC F<sub>4</sub></b>	48.9 g

En outre, compte tenu du démarrage d'un développement industriel de l'extrait de *Tambourissa trichophylla* par Serdex, nous avons eu à notre disposition quelques grammes d'extraits **TTI F<sub>3</sub>** provenant de lots différents de plantes (appelés lot 0227, lot 0408 et lot 0418).

## 2. Méthodes chromatographiques analytiques

### 2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Utilisées à chaque étape pour le suivi et le contrôle des purifications, les chromatogrammes sur couche mince permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits suivis.

Les analyses sur couche mince sont réalisées en phase normale sur des plaques d'aluminium Silicagel 60 F<sub>254</sub> (Merck). Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. Cette phase mobile est constituée d'un mélange binaire, tertiaire ou quaternaire de solvants selon le type de séparation souhaitée.

Dans notre cas, les systèmes de solvants pour les différentes classes de composés sont les suivants (les proportions sont données en volume et ils sont classés par polarité croissante) :

- Tol / AcOEt / MeOH (80 : 18 : 2)
- HCCl<sub>3</sub> / MeOH (90 : 10)
- HCCl<sub>3</sub> / MeOH / H<sub>2</sub>O (65 : 25 : 4)
- AcOEt / MeOH / H<sub>2</sub>O (100 : 13.5 : 10)
- AcOEt / Acide formique / Acide acétique / H<sub>2</sub>O (100 : 11 : 11 : 20)

L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 356 nm), avant et, dans certains cas, après révélation par les réactifs appropriés.

L'utilisation de différents réactifs permet de rassembler judicieusement les fractions récoltées suites aux différentes chromatographies

Les réactifs utilisés pour le présent travail sont les suivants :

**Réactif à la Vanilline sulfurique (Révélateur polyvalent).**

Préparer une solution composée de 1 g de vanilline, 2 ml d'acide sulfurique et de l'éthanol à 95% q.s.p. 100 ml. Après pulvérisation, chauffer la plaque de CCM à 110°C pendant 5 minutes environ. Plusieurs colorations apparaissent en fonction du type de composés.

**Réactif de Neu ou NP/PEG (Révélateur des flavonoïdes).**

Préparer une solution A composée de 1 g d'acide amino-2-éthylidiphénylborique et de 100 mL de méthanol et une solution B composée de 5 g de PEG 4000 et de 100 mL d'éthanol. Pulvériser un mélange de 10 mL de solution A et 8 mL de solution B. Chauffer la plaque de CCM à 110 °C pendant 2 minutes environ [Wagner et Blatt, 2001]. Observés en lumière UV à 366 nm, les flavonoïdes apparaissent sous forme de taches fluorescentes jaunes, vertes ou orange.

**Réactif de Dragendorff (Révélateur des alcaloïdes).**

Préparer une solution composée de 0,85 g de nitrate basique de bismuth et 10 g d'acide tartrique dans 40 mL d'eau (solution A) et une solution contenant 16 g de KI dans 40 mL d'eau (solution B). Mélanger extemporanément 5 mL de A, 5 mL de B, 100 mL d'eau et 20 g d'acide tartrique. Vaporiser le mélange sur la plaque [Merck, 1975]. Les alcaloïdes apparaissent sous forme de taches orange.

**Réactif au Thymol sulfurique (Réactif des sucres).**

Préparer une solution composée de 0,5 g de thymol dans 95 mL d'éthanol puis ajouter 5 mL d'acide sulfurique concentré. Après pulvérisation, chauffer la plaque de CCM à 110°C pendant 15 minutes environ. Les sucres apparaissent sous forme de taches roses [Merck, 1975].

**Réactif au sel de Bleu solide B (pour la détection des phénols et des tanins).**

Vaporiser avec une solution de 0,5 g sel de bleu solide B (sel de diazonium du di-*O*-anisidine) dans un mélange acétone / eau (9:1, V/V), fraîchement préparé. Puis vaporiser avec 0,1 M d'une solution de soude caustique. Les tanins apparaissent sous forme de taches rouge vif.

**Réactif de Liebermann et Burchard (Réactif des stérols, stéroïdes et triterpènes).**

Préparer, à basse température et juste avant emploi, une solution de 5 mL d'anhydride acétique, 5 mL d'acide sulfurique concentré et q.s.p. 50 mL d'éthanol à 95 %. Après pulvérisation, chauffer la plaque de CCM à 110°C pendant 10 minutes. Les composés révélés présentent en fluorescence à 366 nm.

## 2.2. Chromatographie liquide haute performance (HPLC/DAD-UV)

Les analyses HPLC/UV(DAD) ont été effectuées à l'aide d'une chaîne HPLC Merck Hitachi Lachrom munie d'une pompe Lachrom 7100 et d'un détecteur UV à barrettes de diodes (DAD-UV) Merck Hitachi Lachrom 7455 pilotés par le logiciel D-7000 HSM (Merck).

Les analyses ont été réalisées en phase inverse avec une colonne HPLC de type LiChrospher RP-18 (Merck) (5  $\mu$ m, 250 x 4.5 mm). Pour toutes les analyses, les conditions chromatographiques sont un gradient de MeCN dans de l'eau acidifiée (acide formique 0.1 %). Les solvants utilisés sont de qualité HPLC et le débit est fixé à 1 mL/min.

En règle générale, pour l'analyse HPLC/UV des extraits bruts, des solutions de 1 à 3 mg/ml ont été utilisées. Le solvant d'injection est de composition identique à celui du solvant initial de l'analyse et le volume d'injection fixé à 20  $\mu$ L.

Conditions chromatographiques particulières :

- Composés **L** et **M** et témoins quercétine et keampférol : élution isocratique MeCN / HCOOH 0.1 % (80 : 20, V/V), pendant 40 min. Détection à 250 nm.
- Composé **N** : élution isocratique MeCN / HCOOH 0.1 % (87 : 13, V/V), pendant 40 min. Détection à 250 nm.
- Composé **O** : élution isocratique MeCN / HCOOH 0.1 % (80 : 20, V/V), pendant 40 min. Détection à 250 nm.
- Analyse de *TTI* : élution par gradient MeCN (A) / HCOOH 0.1 % (B) : 0 à 7 min, 10 % A, 7 à 45 min, de 10 à 20 % de A, de 45 à 55 min, de 20 à 30 % de A puis de 55 à 60 min, de 30 à 50 % de A avant de retourner aux conditions initiales. Détection à 275 et 340 nm.

## 2.3. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

Les analyses LC-MS ont été effectuées sur l'appareillage constitué des éléments suivants :

- Système HPLC Perkin Elmer series 200 muni d'une pompe quaternaire (PE series 200), d'un autosampler (PE series 200) et d'un détecteur UV à barrettes de diodes (PE 785 A).
- Spectromètre de masse à triple quadripôle Perkin-Elmer Sciex Api 365 équipé d'une interface d'ionisation electrospray et contrôlé par le logiciel Analyst (version 1.3.1).

Les extraits flavonoïdiques d'*Agauria salicifolia* et *Agauria polyphylla* ont été injectés sur une colonne HPLC C18 Symetry (Waters) (3.5  $\mu$ m, 75 x 4.6 mm). Les séparations ont été menées à température ambiante

avec une phase mobile constituée de deux solvants eau-acide formique 0.1 % (A) et acétonitrile (B) dans les conditions suivantes : de 0 à 35 min, 13 % B pendant 35 min, puis en 2 min un gradient linéaire de 13 à 20 % B, 20 % de B pendant 8 min, puis en 2 min un gradient linéaire de 20 à 100 % B, enfin, retour aux conditions initiales (13 % B) en une minute pour rééquilibrer la colonne avant une nouvelle injection.

Pour toutes les analyses, les solvants utilisés sont de qualité HPLC (SDS, Peypin), le débit est réglé à 0.7 mL/min, et la longueur d'onde de mesure fixée à 260 nm. Le volume d'injection varie entre 20 et 100  $\mu$ L en fonction de composé ou de l'extrait injecté.

### **3. Méthodes chromatographiques préparatives**

#### **3.1. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)**

Pour les chromatographies sur colonnes ouvertes, plusieurs types de phases ont été mis en œuvre dans des colonnes en verre. La taille et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier et de la résolution souhaitée.

Pour les chromatographies d'adsorption, la phase stationnaire utilisée est la silice en phase normale SDS 60 Å 70-200  $\mu$ m (SDS, Peypin) préalablement activée quelques heures à l'étuve à 110 °C. L'élution est réalisée par simple gravité. La quantité de silice utilisée est généralement 30 à 50 fois supérieure à la quantité d'échantillon déposée. L'extrait à fractionner est adsorbé sur une quantité de silice correspondant à environ 2 fois sa masse et le dépôt de l'extrait a lieu sous forme solide.

Les chromatographies d'exclusion sont réalisées sur gel de Sephadex ® LH20.

Les fractions recueillies sont regroupées selon les résultats de l'analyse par CCM.

#### **3.2. Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC)**

La chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC) est réalisée à l'aide d'une pompe Büchi 688, sur colonnes de chromatographie moyenne pression en verre Büchi remplies soit avec de la silice SDS 60 Å 6-35  $\mu$ m (SDS, Peypin) en phase normale (préalablement activée quelques heures à l'étuve à 110 °C), soit avec de la silice en phase inverse de type C18 90 Å 40-60  $\mu$ m (AIT, Le Mesnil le Roy).

L'échantillon est introduit sous forme solide mélangé à la phase stationnaire. Les systèmes d'élution utilisés sont généralement des mélanges binaires dans des proportions variables au cours de l'élution. La colonne est éluée avec un débit d'environ 20 mL/min et la pression est en moyenne de 2 bar.

Les fractions recueillies sont regroupées selon les résultats de l'analyse par CCM.

#### **3.3. Chromatographie sur cartouches de silice C18 (VAC ELUT®)**

Les colonnes prêtes à l'emploi Analytichem MEGA BOND ELUT™ (VARIAN) utilisées sont garnies de silice greffée C18. Ces cartouches, associées à une unité de filtration sous vide Vac Elut® SPS 24 (Analytichem International), autorisent un réglage de débit précis à l'aide d'une molette et d'un manomètre, sous vide contrôlé.

### 3.4. Chromatographie préparative sur couche mince

Le composé **I** a été purifié par chromatographie préparative sur couche mince. Les plaques utilisées sont des plaques gel de silice de 2 mm sur verre (Merck 60 F<sub>254</sub>). L'échantillon a été solubilisé dans du chloroforme puis déposé sur la plaque à l'aide d'un déposeur automatique Camag ATS4. La plaque a été développée dans une cuve saturée contenant le mélange Tol / MeOH (90 : 10, V/V)

Une frange de la plaque a été révélée par pulvérisation du réactif à la vanilline sulfurique. La silice contenant le composé **I** a ensuite été récupérée à l'aide d'une spatule. La silice est ensuite dispersée dans une petite quantité de solvant, puis filtrée sous vide pour permettre la récupération du composé **I**.

### 3.5. Chromatographie de partage centrifuge (CPC)

Basée sur une technique de chromatographie de partage liquide/liquide, la chromatographie de partage centrifuge (CPC) utilise le principe de partage des solutés entre deux phases liquides non miscibles, préparées par mélange de deux ou plusieurs solvants ou solutions. Une phase est maintenue stationnaire par une force centrifuge, l'autre pompée au travers, joue le rôle de phase mobile permettant ainsi des échanges entre les deux phases.

La chromatographie de partage centrifuge a été utilisée pour fractionner l'extrait **F<sub>3</sub>** de *Tambourissa trychophylla*.

Ce fractionnement a été effectué grâce à un appareil FCPC Chromaton muni d'un rotor de 200 mL réglé à la vitesse de rotation de 2000 tours/min. La phase stationnaire est constituée de la phase supérieure du mélange tertiaire AcOEt / EtOH / H<sub>2</sub>O (2 : 1 : 2), la phase inférieure constituant la phase mobile est délivrée par une pompe Varian PS. L'élution se fait en mode descendant à un débit de 8 mL/min.

Les fractions ont été recueillies grâce à un collecteur automatique Varian PS et regroupées selon les résultats de l'analyse par CCM.

### 3.6. Chromatographie liquide haute performance semi-préparative (HPLC semi-prép.)

Le système HPLC semi-préparative est constitué de deux pompes Varian PS 218, d'un détecteur Varian PDA PS, d'un enregistreur Varian Star et d'un collecteur de fractions Varian PS 701.

La séparation a été réalisée sur une colonne XTerra RP18 (Waters) (10 µm, 19 x 250 mm) en utilisant une pré-colonne XTerra RP18 (Waters). Le système de solvants employé est MeCN / H<sub>2</sub>O additionné de 0.1 % d'acide formique. Le débit d'élution est de 21.6 mL/min. La détection se fait à 250 nm.

Conditions chromatographiques spécifiques :

- Composé **D** : élution par gradient MeCN / HCOOH 0.1 % (10 : 90) à (20 : 80) en 20 minutes. Le composé **D** est élué à 18 minutes.
- Composé **H** : élution isocratique par MeCN / acide formique 0.3 % (30 : 70) pendant 40 min. Le composé **H** est élué à 27 minutes.

## 4. Méthodes physico-chimiques

### 4.1. Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire des molécules **B** et **G** a été mesuré sur un polarimètre de type Perkin-Elmer 241 à la longueur d'onde de la raie D du sodium ( $\lambda = 589$  nm) dans une cuve de 10 cm à température ambiante. Le pouvoir rotatoire spécifique  $[\alpha]_D$ , exprimé en degré, est calculé à partir de la formule suivante :

$$[\alpha]_D = 1000 \cdot \alpha / l \cdot c$$

( $\alpha$  : angle de rotation, en degré, lu sur le polarimètre,  $l$  : longueur, en dm, de la cuve de mesure,  $c$  : concentration de la molécule en solution en g/L)

### 4.2. Spectrométrie Ultraviolet (UV)

Les spectres U.V. des composés ont été mesurés dans le méthanol à l'aide d'un spectrophotomètre de type Perkin-Elmer UV/Vis Lambda 20, double faisceau permettant des lectures directes contre témoin. Les mesures se font dans des cuves de quartz à trajet optique de 1 cm.

### 4.3. Spectrométrie Infra-rouge (IR)

Les spectres infra-rouge des molécules ont été réalisés au moyen d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer Paragon 1000 FT-IR dans des pastilles de KBr.

### 4.4. Spectrométrie de masse (MS)

Les spectres de masse des produits purs isolés ont été obtenus par plusieurs modes d'ionisation.



### **Ionisation par Electrospray (*Electro Spray Ionisation*) ESI**

L'ionisation est ici produite par application, à pression atmosphérique, d'un fort champ électrique (3 à 6 KeV) sur un liquide traversant un capillaire à un faible débit (1-10  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Ce champ provoque une accumulation de charges à la surface du liquide, situé à l'extrémité du capillaire. La rupture de la phase liquide forme des gouttelettes hautement chargées (Spray). L'évaporation du solvant contenu dans ces gouttelettes va provoquer leur rétrécissement jusqu'au sommet où des forces coulombiennes répulsives vont approcher le niveau des forces de cohésion de celle-ci et provoquer leur explosion. Ces gouttelettes subissent alors une cascade de fissions donnant des gouttelettes de plus en plus petites, jusqu'au moment où le champ électrique en leur surface devient suffisant pour provoquer la désorption des ions. Ces ions ainsi produits sont porteurs d'un grand nombre de charges s'il existe plusieurs sites ionisables sur la molécule.

Les spectres ESI ont été enregistrés en modes positifs et négatifs sur un spectromètre à triple quadripôle Sciex API 365 (Perkin-Elmer) contrôlé par le logiciel Analyst (Agilent, version 1.3.1).

### **Ionisation par chimique à pression atmosphérique (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) APCI**

L'APCI est une technique d'ionisation qui fait appel à des réactions ions-molécules en phase gazeuse à pression atmosphérique. C'est une technique analogue à l'ionisation chimique (CI) où les ions primaires sont produits par des décharges Corona sur un aérosol de solvant. L'éluat chromatographique (*maximum* 2 mL/min) est directement introduit dans un nébuliseur pneumatique où il est converti en un fin brouillard à l'aide d'un jet d'air ou d'azote à haute vitesse. Les gouttelettes sont alors déplacées par le flux gazeux au travers d'un tube de quartz chauffé, appelé chambre de désolvatation / vaporisation. La chaleur transférée aux gouttelettes de l'aérosol va permettre la vaporisation de la phase mobile et de l'échantillon dans le courant de gaz. Le contrôle de la température dans cette chambre rend les conditions de vaporisation dépendantes du débit et de la nature de la phase mobile. Le gaz chaud (120 °C) et les substances sortent de ce tube pour arriver dans la région de transfert de la source se trouvant à pression atmosphérique où ils sont ionisés chimiquement par le transfert de protons en mode positif et le transfert d'électrons en mode négatif. En général, la phase mobile vaporisée joue le rôle de gaz ionisant en produisant des ions pseudo-moléculaires [de Hoffman et al., 1999].

Les spectres APCI ont été réalisés sur un spectromètre à trappe d'ion Finnigan LCQ *ion trap* (ThermoFinnigan).

### **Impact Electronique (*Electronic Impact*) EI**

En EI, un faisceau d'électrons de haute énergie bombarde les molécules en phase gazeuse et le spectromètre de masse enregistre les impacts d'électrons sous la forme d'un spectre d'ions positifs séparés sur la base du rapport masse/charge ( $m/z$ ). Les fragments sont formés à partir de l'ion moléculaire et la plupart d'entre eux portent une charge positive unitaire. L'ionisation par impact électronique présente un inconvénient quant au repérage de l'ion moléculaire, d'intensité souvent très faible, voire indétectable.

Les spectres de masse en EI ont été réalisés sur un spectromètre Nermag R-10-10 avec un champ de 70 eV.

### Spectrométrie de masse haute résolution

Les spectres de masse de haute résolution ont été enregistrés en electrospray sur un appareil Q-Tof Ultima (Waters). Ces analyses ont été menées par Véréna Poinot du Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique de l'Université Paul Sabatier de Toulouse.

## 4.5. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été enregistrés au service commun de RMN de l'Université Paul Sabatier de Toulouse sur des appareils de type Brüker Avance 300 (fréquences de 300.13 ( $^1\text{H}$ ) et 75.46 MHz ( $^{13}\text{C}$ )), ou Brüker Avance 500 avec cryosonde (fréquences de 500.13 ( $^1\text{H}$ ) et 125.75 MHz ( $^{13}\text{C}$ )) selon la quantité de produit à analyser et la résolution souhaitée.

Les échantillons ont été solubilisés dans les solvants deutérés  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$  et  $\text{D}_2\text{O}$  (Euriso-top, Gif sur Yvette) dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre.

Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS) ; les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

Les programmes de séquences impulsionnelles standard fournies par Brüker ont permis de réaliser les expériences bidimensionnelles COSY, NOESY, HSQC et HMBC.

### Corrélations homonucléaires

- **COSY** ( $^1\text{H} - ^1\text{H}$ ) : cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires  $2J$  et  $3J$  (protons séparés par deux ou trois liaisons) entre les protons voisins et ceux qui sont adjacents.
- **NOESY** ( $^1\text{H} - ^1\text{H}$ ) : cette technique permet d'observer, dans l'espace, les corrélations entre protons (effets Overhauser) d'une même molécule.

### Corrélations hétéronucléaires

- **HSQC** ( $^1J_{\text{H-C}}$ ) : cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés entre eux.
- **HMBC** ( $^2J_{\text{H-C}}$ ,  $^3J_{\text{H-C}}$ ) : cette technique permet la détection des couplages longue distance  $^2J_{\text{H-C}}$  et  $^3J_{\text{H-C}}$ .

## **VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Ablajan K., Abliz Z., Shang X.Y., He J.M., Zhang R.P., and Shi J.G. (2006) **Structural characterization of flavonol 3,7-di-O-glycosides and determination of the glycosylation position by using negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry.** *Journal of Mass Spectrometry* 41(3), 352-360.
- Agrawal P.K. (1992) **NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides.** *Phytochemistry* 31(10), 3307-3330.
- Agrawal P.K., and Markham K.R. (1989) **Carbon-13 NMR of flavonoids.** Elsevier. Amsterdam.
- Agrawal P.K., and Markham K.R. (1989) **Introduction.** In *Carbon-13 NMR of flavonoids*. Agrawal P.K. Ed. Elsevier. Amsterdam. pp 1-31.
- Ali M., Heaton A., and Leach D. (1997) **Triterpene Esters from Australian *Acacia*.** *Journal of Natural Products* 60, 1150-1156.
- Ammann W., Richarz R., Wirthlin T., and Wendisch D. (1982)  **$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shifts and coupling constants of lupane. Application of two-dimensional NMR techniques.** *Organic Magnetic Resonance* 20(4), 260-265.
- APG (1998) **An Ordinal Classification for the Families of Flowering Plants.** *Annals of the Missouri Botanical Garden* 85, 531-553.
- APG (2003) **An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants.** *Botanical Journal of the Linnean Society* 141, 399-436.
- Arot L.O.M., and Williams L.A.D. (1997) **A flavonol glycoside from *Embelia schimperi* leaves.** *Phytochemistry* 44(7), 1397-1398.
- Boegh H.O., Andreassen J., and Lemmich J. (1996) **Anthelmintic usage of extracts of *Embelia schimperi* from Tanzania.** *Journal of Ethnopharmacology* 50(1), 35-42.
- Boiteau P. (1986) ***Précis de matière médicale malgache.*** Agence de coopération culturelle et technique. Paris.
- Boiteau P., Nigeon-Dureuil M., Rabinovicz M., and Raynaud-Jaquard S. (1959) **A new triterpenoid, responsible for the curarizing action of *Agauria salicifolia* Hook.f., one of the *Ericaceae* from Madagascar.** *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* 249(2), 309-311.
- Bosser J., Cadet T., Guého J., and Marais W. (1981) ***Flore des Mascareignes La Réunion, Maurice, Rodrigues. 111. Campanulaceae (supplément) à 120. Salvadoraceae.*** Royal Botanic Gardens. Kew.
- Brophy J.J., Forster P.I., and Goldsack R.J. (1998) **Essential oils of some Australian *Monimiaceae*.** *Flavour and Fragrance Journal* 13(4), 273-276.
- Brophy J.J., Goldsack R.J., and Forster P.I. (2005) **The leaf oils of the australian species of *Hedycarya* (*Monimiaceae*).** *The Journal of essential oil research* 17(4), 432-436.

- Bruneton J. (1999) **Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales**. Lavoisier Technique & Documentation. Paris.
- Budzikiewicz H., Wilson J.M., and Djerassi C. (1963) **Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. XXXII. Pentacyclic Triterpenes**. *Journal of the American Chemical Society* 85(22), 3688-3699.
- Burkill H.M. (1994) **The Useful Plants of West Tropical Africa, Families E-I**. Royal Botanic Gardens. Kew.
- Cao Y., Yang L., Gao H.L., Chen J.N., Chen Z.Y., and Ren Q.S. (2007) **Re-characterization of three conjugated linolenic acid isomers by GC-MS and NMR**. *Chemistry and Physics of Lipids* 145(2), 128-133.
- Careri M., Elviri L., and Mangia A. (1999) **Validation of a liquid chromatography ionspray mass spectrometry method for the analysis of flavanones, flavones and flavonols**. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 13(23), 2399-2405.
- Cavaco A., and Humbert H. (1957) **Flore de Madagascar et des Comores : plantes vasculaires. 80e famille, Monimiacees** Firmin-Didot. Paris.
- Chaturvedula V.S.P., Schilling J.K., Malone S., Wisse J.H., Werkhoven M.C.M., and Kingston D.G.I. (2003) **New Cytotoxic Triterpene Acids from Aboveground Parts of *Manihot esculenta* from the Suriname Rainforest**. *Planta Medica* 69, 271-274.
- Chaudhury M.R., Chandrasekaran R., and Mishra S. (2001) **Embryotoxicity and teratogenicity studies of an ayurvedic contraceptive-pippaliyadi vati**. *Journal of Ethnopharmacology* 74(2), 189-193.
- Chitra M., Devi C.S., and Sukumar E. (2003) **Antibacterial activity of embelin**. *Fitoterapia* 74(4), 401-403.
- Claros B.M., da Silva A.J., Vasconcellos M.L., de Brito A.P., and Leitao G.G. (2000) **Chemical constituents of two *Mollinedia* species**. *Phytochemistry* 55(7), 859-862.
- Clifford M.N. (2003) **The analysis and characterization of chlorogenic acids and other cinnamantes**. In *Methods in Polyphenol Analysis*. Santos-Buelga C. and Williamson G. Eds. Royal Society of Chemistry. Cambridge. pp 314-337.
- Clifford M.N., Knight S., and Kuhnert N. (2005) **Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS<sup>n</sup>**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(10), 3821-3832.
- Colombo R., Lancas F.M., and Yariwake J.H. (2006) **Determination of flavonoids in cultivated sugarcane leaves, bagasse, juice and in transgenic sugarcane by liquid chromatography-UV detection**. *Journal of Chromatography A* 1103, 118-124.
- Constant H.L., Slowing K., Graham J.G., Pezzuto J.M., Cordell G.A., and Beecher C.W.W. (1997) **A general method for the dereplication of flavonoid glycosides utilizing high performance liquid chromatography/mass spectrometric analysis**. *Phytochemical Analysis* 8(4), 176-180.
- Cooper-Driver G.A., and Bhattacharya M. (1998) **Role of phenolics in plant evolution**. *Phytochemistry* 49(5), 1165-1174.

- Cronquist A. (1988) ***The Evolution and Classification of Flowering Plants***. The New York Botanical Garden. New York.
- Culioli G., Mathe C., Archier P., and Vieillescazes C. (2003) **A lupane triterpene from frankincense (*Boswellia* sp., *Burseraceae*)**. *Phytochemistry* 62(4), 537-541.
- Cuyckens F., and Claeys M. (2004) **Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids**. *Journal of Mass Spectrometry* 39(4), 1-15.
- Cuyckens F., and Claeys M. (2005) **Determination of the glycosylation site in flavonoid mono-O-glycosides by collision-induced dissociation of electrospray-generated deprotonated and sodiated molecules**. *Journal of Mass Spectrometry* 40(3), 364-372.
- Cuyckens F., Ma Y.L., Pocsfalvi G., and Claeys M. (2000) **Tandem mass spectral strategies for the structural characterization of flavonoid glycosides**. *Analisis* 28(10), 888-895A.
- Cuyckens F., Rozenberg R., de Hoffmann E., and Claeys M. (2001) **Structure characterization of flavonoid O-diglycosides by positive and negative nano-electrospray ionization ion trap mass spectrometry**. *Journal of Mass Spectrometry* 36(11), 1203-1210.
- Cuyckens F., Shahat A.A., Pieters L., and Claeys M. (2002) **Direct stereochemical assignment of hexose and pentose residues in flavonoid O-glycosides by fast atom bombardment and electrospray ionization mass spectrometry**. *Journal of Mass Spectrometry* 37(12), 1272-1279.
- Davis A.L., Cai Y., Davies A.P., and Lewis J.R. (1996)  **$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Assignments of Some Green Tea Polyphenols**. *Magnetic Resonance in Chemistry* 34, 887-890.
- Davis B.D., and Brodbelt J.S. (2005) **LC-MS<sup>n</sup> Methods for Saccharide Characterization of Monoglycosyl Flavonoids Using Postcolumn Manganese Complexation**. *Analytical Chemistry* 77(6), 1883-1890.
- Davis B.D., Needs P.W., Kroon P.A., and Brodbelt J.S. (2006) **Identification of isomeric flavonoid glucuronides in urine and plasma by metal complexation and LC-ESI-MS/MS**. *Journal of Mass Spectrometry* 41(7), 911-920.
- de Hoffmann E., Charette J., and Stroobant V. (1999) ***Spectrométrie de masse***. Dunod. Paris.
- de Rijke E., Out P., Niessen W.M., Ariese F., Gooijer C., and Brinkman U.A. (2006) **Analytical separation and detection methods for flavonoids**. *Journal of Chromatography A* 1112, 31-63.
- de Rijke E., Zappey H., Ariese F., Gooijer C., and Brinkman U.A.T. (2003) **Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple-quadrupole and ion-trap instruments**. *Journal of Chromatography A* 984(1), 45-58.
- Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., and Capasso F. (1999) **Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs**. *Life Sciences* 65(4), 337-353.

DNP (2006). **Dictionary of Natural Products on CD-ROM. version 13:2.** Chapman & Hall/CRC.

Dussy J., and Sosa A. (1951) **Chemical composition of a poisonous species of *Ericaceae*, the angavodiana tree of Madagascar.** *Bulletin de la Societe de Chimie Biologique* 33, 1672-1678.

Endale A., Wray V., Murillo R., Schmidt P.C., and Merfort I. (2005) **Hopane-type saponins from the seeds of *Glinus lotoides*.** *Journal of Natural Products* 68(3), 443-446.

Ewane-Nyambi G., Bois P., and Raymond G. (1993) **The effects of *Agauria salicifolia* leaf extract on calcium current and excitation-contraction coupling of isolated frog muscle cells.** *Journal of Ethnopharmacology* 38(1), 55-61.

Ewane-Nyambi G., Bois P., and Raymond G. (1993) **The voltage-dependent effect of *Agauria salicifolia* leaf extract on the sodium current of isolated frog skeletal and cardiac muscle cells.** *Journal of Ethnopharmacology* 38(1), 39-47.

Ewane-Nyambi G., and Raymond G. (1993) **The effect of *Agauria salicifolia* leaf extract on the sodium current of tetrodotoxin-treated frog skeletal muscle fibres.** *Journal of Ethnopharmacology* 38(1), 49-53.

Exarchou V., Fiamegos Y.C., van Beek T.A., Nanos C., and Vervoort J. (2005) **Hyphenated chromatographic techniques for the rapid screening and identification of antioxidants in methanolic extracts of pharmaceutically used plants.** *Journal of Chromatography A*.

Fabre N., Rustan I., de Hoffmann E., and Quetin-Leclercq J. (2001) **Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry.** *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 12(6), 707-715.

Ferrerres F., Llorach R., and Gil-Izquierdo A. (2004) **Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry.** *Journal of Mass Spectrometry* 39(3), 312-321.

Franski R., Eitner K., Sikorska M., Matlawska I., and Stobiecki M. (2003) **Electrospray mass spectrometric decomposition of some glucuronic acid-containing flavonoid diglycosides.** *Phytochemical Analysis* 14(3), 170-175.

Gallori S., Bilia A.R., Mulinacci N., Bicchi C., Rubiolo P., and Vincieri F.F. (2001) **Identification of volatile constituents of *Tambourissa leptophylla*.** *Planta Medica* 67(3), 290-292.

Grayer R.J., Chase M.W., and Simmonds M.S.J. (1999) **A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families: An appreciation of Hegnauer's "Chemotaxonomie der Pflanzen".** *Biochemical Systematics and Ecology* 27(4), 369-393.

Grégoire J., and Nyembo L. (1977) **Triterpenoids from *Agauria salicifolia*.** *Phytochemistry* 16(10), 1609-1610.

Gurib-Fakim A. (2006) **Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow.** *Molecular Aspects of Medicine* 27, 1-93.

- Haq K., Ali M., and Siddiqui A.W. (2005) **New compounds from the seeds of *Embelia ribes* Burm.** *Pharmazie* 60(1), 69-71.
- Harborne J.B. (1988) ***The flavonoids, Advances in research since 1980***. Chapman & Hall. London.
- Hegnauer R. (1966) ***Chemotaxonomie der Pflanzen. Band IV Dicotyledoneae : Daphniphyllaceae-Lythraceae***. Birkhauser Verlag. Basel.
- Hegnauer R. (1969) ***Chemotaxonomie der Pflanzen. Band V Dicotyledoneae : Magnoliaceae-Quinaceae***. Birkhäuser Verlag. Basel.
- Hegnauer R. (1989) ***Chemotaxonomie der Pflanzen - Band VIII (Acanthaceae bis Lythraceae)***. Birkhäuser Verlag. Basel.
- Hegnauer R. (1990) ***Chemotaxonomie der Pflanzen. Band IX (Magnoliaceae bis Zygophyllaceae)***. Birkhäuser Verlag. Basel.
- Heitz S., and Billet D. (1973) ***Embelia concinna (Myrsinaceae) triterpenes***. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences, Série C : Sciences Chimiques* 277(16), 1703-1704.
- Heller W., and Forkmann G. (1993) **Biosynthesis of Flavonoids**. In *The Flavonoids: Advances in research since 1986*. Harborne J.B. Ed. Chapman & Hall. London. pp 499.
- Hirota M., Miyazaki S., Minakuchi T., Takagi T., and Shibata H. (2002) **Myrsinoic Acids B, C and F, Anti-inflammatory Compounds from *Myrsine seguinii***. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 66(3), 655-659.
- Hollman P.C.H. (2001) **Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects?** *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81(9), 842-852.
- Hollman P.C.H., and Arts I.C.W. (2000) **Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden**. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80(7), 1081-1093.
- Hollman P.C.H., and Katan M.B. (1997) **Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man**. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 51(8), 305-310.
- Hughes R.J., Croley T.R., Metcalfe C.D., and March R.E. (2001) **A tandem mass spectrometric study of selected characteristic flavonoids**. *International Journal of Mass Spectrometry* 210-211, 371-385.
- Hvattum E., and Ekeberg D. (2003) **Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry**. *Journal of Mass Spectrometry* 38(1), 43-49.
- Hvattum E., Stenstrøm Y., and Ekeberg D. (2004) **Study of the reaction products of flavonols with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl using liquid chromatography coupled with negative electrospray ionization tandem mass spectrometry**. *Journal of Mass Spectrometry* 39(12), 1570-1581.



- IUPAC (1976) **Nomenclature of cyclitols**. *Biochemical Journal* 153, 23-31.
- Iwashina T. (2000) **The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants**. *Journal of Plant Research* 113(3), 287-299.
- Justesen U. (2001) **Collision-Induced fragmentation of deprotonated methoxylated flavonoids, obtained by electrospray ionization mass spectrometry**. *Journal of Mass Spectrometry* 36, 169-178.
- Kallersjö M., Bergqvist G., and Anderberg A.A. (2000) **Generic realignment in primuloid families of the Ericales: a phylogenetic analysis based on DNA sequences from three chloroplast genes and morphology**. *American Journal of Botany* 87(9), 1325-1341.
- Karliner J., and Djerassi C. (1966) **Terpenoids. LVII. Mass Spectral and Nuclear Magnetic Resonance Studies of Pentacyclic Triterpene Hydrocarbon**. *The Journal of Organic Chemistry* 31(6), 1945-1956.
- Kawashty S.A., and El-Garf I.A. (2000) **The flavonoid chemosystematics of Egyptian Verbena species**. *Biochemical Systematics and Ecology* 28(9), 919-921.
- Kobayashi H., and de Meijia E. (2005) **The genus Ardisia: a novel source of health-promoting compounds and phytopharmaceuticals**. *Journal of Ethnopharmacology* 96(3), 347-354.
- Kozubek A., and Tyman J.H. (1999) **Resorcinolic Lipids, the Natural Non-isoprenoid Phenolic Amphiphiles and Their Biological Activity**. *Chemical Reviews* 99(1), 1-26.
- Kretzschmar H. (1952) **Pharmacological action of the alkaloids from Peumus boldus**. *Pharmazie* 7, 507-511.
- Krishnaswamy M., and Purushothaman K.K. (1980) **Antifertility properties of Embelia ribes**. *Indian Journal of Experimental Biology* 18(6), 638-639.
- Kron K.A., and Judd W.S. (1997) **Systematics of the Lyonia Group (Andromedeae, Ericaceae) and the Use of Species as Terminals in Higher-Level Cladistic Analyses**. *Systematic Botany* 22(3), 479-492.
- Kron K.A., Judd W.S., and Crayn D.M. (1999) **Phylogenetic analyses of Andromedeae (Ericaceae subfam. Vaccinioideae)**. *American Journal of Botany* 86(9), 1290-1300.
- Kumara Swamy H.M., Krishna V., Shankarmurthy K., Abdul Rahiman B., Mankani K.L., Mahadevan K.M., Harish B.G., and Raja Naika H. (2007) **Wound healing activity of embelin isolated from the ethanol extract of leaves of Embelia ribes Burm.** *Journal of Ethnopharmacology* 109(3), 529-534.
- Laphookhieo S., Karalai C., Ponglimanont C., and Chantrapromma K. (2004) **Pentacyclic triterpenoid esters from the fruits of Brugiera cylindrica**. *Journal of Natural Products* 67(5), 886-888.
- Lauranson J., Vekemans X., Lefebvre C., and Jay M. (1995) **Flavonoid Profiles Variation in Armeria maritima (Mill.) Willd.** *Biochemical Systematics and Ecology* 23(3), 319-329.
- Lee J.S., Kim D.H., Liu K.H., Oh T.K., and Lee C.H. (2005) **Identification of flavonoids using liquid**

- chromatography with electrospray ionization and ion trap tandem mass spectrometry with an MS/MS library.** *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19(23), 3539-3548.
- Leitão G.G., Simas N.K., Soares S.S.V., de Brito A.P.P., Claros B.M.G., Brito T.B.M., and Delle Monache F. (1999) **Chemistry and pharmacology of *Monimiaceae*: a special focus on *Siparuna* and *Mollinedia*.** *Journal of Ethnopharmacology* 65(2), 87-102.
- Lorence D.H. (1985) **A Monograph of the *Monimiaceae* (*Laurales*) in the Malagasy Region (Southwest Indian Ocean).** *Annals of the Missouri Botanical Garden* 72(1), 1-165.
- Loriaux I., Boiteau P., and Husson H.P. (1973) **Isolation of grayanotoxins from leaves of *Agauria polyphylla*.** *Phytochemistry* 12(6), 1500.
- Lund A.K., Lemmich J., Adersen A., and Olsen C.E. (1997) **Benzoquinones from *Embelia angustifolia*.** *Phytochemistry* 44(4), 679-681.
- Ma Y.L., Cuyckens F., Van den Heuvel H., and Claeys M. (2001) **Mass spectrometric methods for the characterisation and differentiation of isomeric O-diglycosyl flavonoids.** *Phytochemical Analysis* 12(3), 159-165.
- Ma Y.L., Li Q.M., Van den Heuvel H., and Claeys M. (1997) **Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry.** *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 11(12), 1357-1364.
- Ma Y.L., Vedernikova I., Van den Heuvel H., and Claeys M. (2000) **Internal glucose residue loss in protonated O-diglycosyl flavonoids upon low-energy collision-induced dissociation.** *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 11(2), 136-144.
- Maberley D.J. (1987) ***The Plant-book. A portable dictionary of the higher plants.*** Cambridge University Press. Cambridge.
- Mabry T.J., Markham K.R., and Thomas M.B. (1970) ***The systematic identification of flavonoids.*** Springer-Verlag. Berlin.
- Machocho A.K., Kiprono P.C., Grinberg S., and Bittner S. (2003) **Pentacyclic triterpenoids from *Embelia schimperi*.** *Phytochemistry* 62(4), 573-577.
- Mahato S.B., and Kundu A.P. (1994) **<sup>13</sup>C-NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids-a compilation and some salient features.** *Phytochemistry* 37(6), 1517-1575.
- Makabe H., Miyazaki S., Kamo T., and Hirota M. (2003) **Myrsinoic Acid E, an Anti-inflammatory Compound from *Myrsine seguinii*.** *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 67(9), 2038-2041.
- Manguro L.O.A., and Williams L.A.D. (1996) **Phenolic compounds from *Embelia keniensis* leaves.** *Planta Medica* 62(4), 384-385.
- Markham K.R. (1982) ***Techniques of Flavonoid Identification.*** Academic Press. London.

- Markham K.R. (1988) **Distribution of flavonoids in the lower plants and its evolutionary significance.** In *The Flavonoids: Advances in research since 1980*. Harborne J.B. Ed. Chapman & Hall. London. pp 427-468.
- Markham K.R., and Ternai B. (1976) **Carbon-13 NMR of flavonoids-II: Flavonoids other than flavone and flavonol aglycones.** *Tetrahedron* 32, 2607-2612.
- Markham K.R., Ternai B., Stanley R., Geiger H., and Mabry T.J. (1978) **Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III: Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives.** *Tetrahedron* 34(9), 1389-1397.
- Marston A., Slacanin I., and Hostettmann K. (1990) **Centrifugal partition chromatography in the separation of natural products.** *Phytochemical Analysis* 1(1), 3-5.
- Marston A., Slacanin I., and Hostettmann K. (1990) **Some new developments in centrifugal partition chromatography and applications in the separation of natural products.** *Journal of liquid chromatography* 13(18), 3615-3624.
- Martinet O., Pommier P., Schlossmacher P., Develay A., and de Haro L. (2005) **Agauria salicifolia intoxication.** *Presse Medicale* 34(11), 797-798.
- Merck E. (1975) **Révélateurs pour la chromatographie en couches minces et sur papier.** Merck. Darmstadt.
- Merken H.M., and Beecher G.R. (2000) **Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(3), 577-599.
- Meselhy M.R., and Aboutabl E.S.A. (1997) **Hopane-type saponins from Polycarpon succulentum growing in Egypt.** *Phytochemistry* 44(5), 925-929.
- Miketova P., Schram K.H., Whitney J.L., Kerns E.H., Valcic S., Timmermann B.N., and Volk K.J. (1998) **Mass spectrometry of selected components of biological interest in green tea extracts.** *Journal of Natural Products* 61(4), 461-467.
- Misra T.N., Singh R.S., Upadhyay J., and Srivastava R. (1984) **Chemical Constituents of Vernonia cinerea. Isolation and Structure Elucidation of a New Pentacyclic Triterpenoid.** *Journal of Natural Products* 47(5), 865-867.
- Mutai C., Abatis D., Vagias C., Moreau D., Roussakis C., and Roussis V. (2004) **Cytotoxic lupane-type triterpenoids from Acacia mellifera.** *Phytochemistry* 65(8), 1159-1164.
- Ogweno Midiwo J., Yenesew A., Juma B.F., Derese S., Ayoo J.A., Aluoch A.O., and Guchu S. (2002) **Bioactive compounds from some Kenyan ethnomedicinal plants: Myrsinaceae, Polygonaceae and Psiadia punctulata.** *Phytochemistry Reviews* 1(3), 311-323.
- Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Schmeda-Hirschmann G., Burillo J., and Codina C. (2004) **Bioguided isolation and identification of the nonvolatile antioxidant compounds from fennel (Foeniculum vulgare Mill.) waste.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 1890-1897.

- Paris R., and Rabenoro C. (1950) **Two *Myrsinaceae* from Madagascar used as vermifuges.** *Annales Pharmaceutiques Françaises* 8, 380-387.
- Pelt J.M. (2001) ***Les nouveaux actifs naturels***. Marabout. Paris.
- Pereira F.B.M., Domingues F.M.J., and Silva A.M.S. (1996) **Triterpenes from *Acacia dealbata*.** *Natural Product Letters* 8, 97-104.
- Perrier de la Bâthie H., and Humbert H. (1953) ***Flore de Madagascar et des Comores : plantes vasculaires. 161e famille, Myrsinacées*** Firmin-Didot. Paris.
- Petsalo A., Jalonen J., and Tolonen A. (2006) **Identification of flavonoids of *Rhodiola rosea* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A* 1112, 224-231.
- Philipson W.R. (1987) **A classification of the *Monimiaceae*.** *Nordic journal of botany* 7(1), 25-29.
- Philipson W.R. (1993) ***Monimiaceae***. In *The families and genera of vascular plants*. Kubitzki K., Rohwer J. and Bittrich V. Eds. Vol. 2. Springer-Verlag. Berlin. pp 426–437.
- Pietta P. (2000) **Flavonoids as Antioxidants.** *Journal of Natural Products* 63(7), 1035-1042.
- Prasain J.K., Wang C.C., and Barnes S. (2004) **Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples.** *Free Radical Biology and Medicine* 37(9), 1324-1350.
- Prashanth D., Padmaja R., and Samiulla D.S. (2001) **Effect of certain plant extracts on alpha-amylase activity.** *Fitoterapia* 72(2), 179-181.
- Rajeriarison C. (1996) **Aperçu bibliographique sur l'origine et les affinités de la flore malgache.** In *Biogéographie de Madagascar*. Lourenço W.R. Ed. ORSTOM. Paris. pp 195-203.
- Rastrelli L., Saturnino P., Schettino O., and Dini A. (1995) **Studies on the Constituents of *Chenopodium pallidicaule* (Canihua) Seeds. Isolation and Characterization of Two New Flavonol Glycosides.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43(8), 2020-2024.
- Renner S.S. (1999) **Circumscription and phylogeny of the *Laurales*: evidence from molecular and morphological data.** *American Journal of Botany* 86(9), 1301-1315.
- Reynolds W.F., McLean S., Poplawski J., Enriquez R.G., Escobar L.I., and Leon I. (1986) **Total assignment of <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H spectra of three isomeric triterpenol derivatives by 2D NMR: an investigation of the potential utility of <sup>1</sup>H chemical shifts in structural investigations of complex natural products.** *Tetrahedron* 42(13), 3419-3428.
- Sannomiya M., Montoro P., Piacente S., Pizza C., Brito A., and Vilegas W. (2005) **Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu.** *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19(16), 2244.

- Satterfield M., and Brodbelt J.S. (2001) **Structural characterization of flavonoid glycosides by collisionally activated dissociation of metal complexes**. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 12(5), 537-549.
- Saucier C., Mirabel M., Daviaud F., Longieras A., and Glories Y. (2001) **Rapid fractionation of grape seed proanthocyanidins**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(12), 5732-5735.
- Schatz G.E. (2001) *Flore Generique des Arbres de Madagascar*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Scott P.M., Coldwell B.B., and Wiberg G.S. (1971) **Grayanotoxins. Occurrence and analysis in honey and a comparison of toxicities in mice**. *Food and Cosmetics Toxicology* 9(2), 179-184.
- Senatore F., D'Agostino M., and Dini I. (2000) **Flavonoid Glycosides of *Barbarea vulgaris* L. (Brassicaceae)**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(7), 2659-2662.
- Servettaz O., Colombo M.L., De Bernardi M., Uberti E., Vidari G., and Vita-Finzi P. (1984) **Flavonol Glycosides from *Dryas octopetala***. *Journal of Natural Products* 47(5), 809-814.
- Seth S.D., Johri N., and Sundaram K.R. (1982) **Antispermatogetic effect of embelin from *Embelia ribes***. *Indian Journal of Pharmacology* 14(2), 207-211.
- Shahat A.A., Cuyckens F., Wang W., Abdel-Shafeek K.A., Hussein H.A., Apers S., Van Miert S., Pieters L., Vlietinck A.J., and Claeys M. (2005) **Structural characterization of flavonol di-O-glycosides from *Farsetia aegyptia* by electrospray ionization and collision-induced dissociation mass spectrometry**. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19, 2172-2178.
- Sosa A., and Dussy J. (1951) **Some new constituents of an African Ericaceae, *Agauria salicifolia* Hook f. ex. Oliv.** *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* 232(24), 2249-2251.
- Spichiger R.E., Savolainen V.V., and Figeat M. (2000) *Botanique Systématique des Plantes à Fleurs*. Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne.
- Stahl B., and Anderberg A.A. (2004) **Myrsinaceae**. In *The families and genera of vascular plants*. Kubitzki K. Ed. Vol. 6. Springer-Verlag. Berlin. pp 266-281.
- Stevens P.F. (1970) ***Agauria* and *Agarista*: an example of tropical transatlantic affinity**. *Notes from the Royal Botanic Garden at Edinburgh* 30, 341-359.
- Stevens P.F. (1971) **A classification of the Ericaceae: subfamilies and tribes**. *Botanical Journal of the Linnean Society* 64, 1-53.
- Stevens P.F. (2001). **Angiosperm Phylogeny Website**. In Version 7, May 2006. [www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/](http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/).
- Stevens P.F., Luteyn J., Oliver E.G.H., Bell T.L., Brown E.A., Crowden R.K., George A.S., Jordan G.J., Ladd P., Lemson K., McLean C.B., Menadue Y., Pate J.S., Stace H.M., and Weiler C.M. (2004) **Ericaceae**. In *The families and genera of vascular plants*. Kubitzki K. Ed. Vol. 6. Springer-Verlag. Berlin. pp 145–194.

- Stobiecki M. (2000) **Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides.** *Phytochemistry* 54(3), 237-256.
- Suzuki Y., Esumi Y., Hyakutake H., Kono Y., and Sakurai A. (1996) **Isolation of 5-(8'-Z-heptadecenyl)-resorcinol from etiolated rice seedlings as an antifungal agent.** *Phytochemistry* 41(6), 1485-1489.
- Suzuki Y., Esumi Y., Uramoto M., Kono Y., and Sakurai A. (1997) **Structural analyses of carbon chains in 5-alk (en) yresorcinols of rye and wheat whole flour by tandem mass spectrometry.** *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 61(3), 480-486.
- Ternai B., and Markham K.R. (1976) **Carbon-13 NMR studies of flavonoids-I: Flavones and flavonols.** *Tetrahedron* 32(5), 565-569.
- Ullah N., Ahmed Z., Ahmed S., Muhammad P., and Malik A. (1999) **A pentacyclic triterpene from Daphne oleoides.** *Phytochemistry* 50(5), 839-841.
- Vatèle J.-M., Fenet B., and Eynard T. (1998) **Complete  $^{13}\text{C}$  assignments and structural elucidation of n-3 polyunsaturated fatty acids by the use of a new 2D NMR technique: SAPHIR-HSQC.** *Chemistry and Physics of Lipids* 94(2), 239-250.
- Vvedenskaya I.O., Rosen R.T., Guido J.E., Russell D.J., Mills K.A., and Vorsa N. (2004) **Characterization of flavonols in cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) powder.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(2), 188-195.
- Wagner H., and Bladt S. (2001) **Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas.** Springer. New-York.
- Watson L., and Dallwitz M.J. (1992). **The families of flowering plants: description, illustration, identification, and information retrieval.** In 2nd version Juin 2006. [www.delta-intkey.com](http://www.delta-intkey.com).
- Wolfender J.L., Maillard M., Marston A., and Hostettmann K. (1992) **Mass spectrometry of underivatized naturally occurring glycosides.** *Phytochemical Analysis* 3, 193-214.
- Wolfender J.L., Waridel P., Ndjoko K., Hobby K.R., Major H.J., and Hostettmann K. (2000) **Evaluation of Q-TOF-MS/MS and multiple stage IT-MS<sup>n</sup> for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts.** *Analisis* 28(10), 895-906.
- Wu P.L., Lin S.B., Huang C.P., and Chiou R.Y.Y. (2002) **Antioxidative and Cytotoxic Compounds Extracted from the Sap of *Rhus succedanea*.** *Journal of Natural Products* 65(11), 1719-1721.
- Wu W., Yan C., Li L., Liu Z., and Liu S. (2004) **Studies on the flavones using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A* 1047(2), 213-220.

### **Sites Internet**

Site Internet du Missouri Botanical Garden : [www.mobot.org/MOBOT/Madagasc/](http://www.mobot.org/MOBOT/Madagasc/).

Site Internet de la Faculté de Pharmacie de Greifswald : <http://pharm1.pharmazie.uni-greifswald.de/gallery/yamasaki.htm>.

Site Internet de la banque de données *Prelude* : utilisation de plantes en médecine traditionnelle vétérinaire et humaine en Afrique sub-Saharienne : [www.metafro.be](http://www.metafro.be)

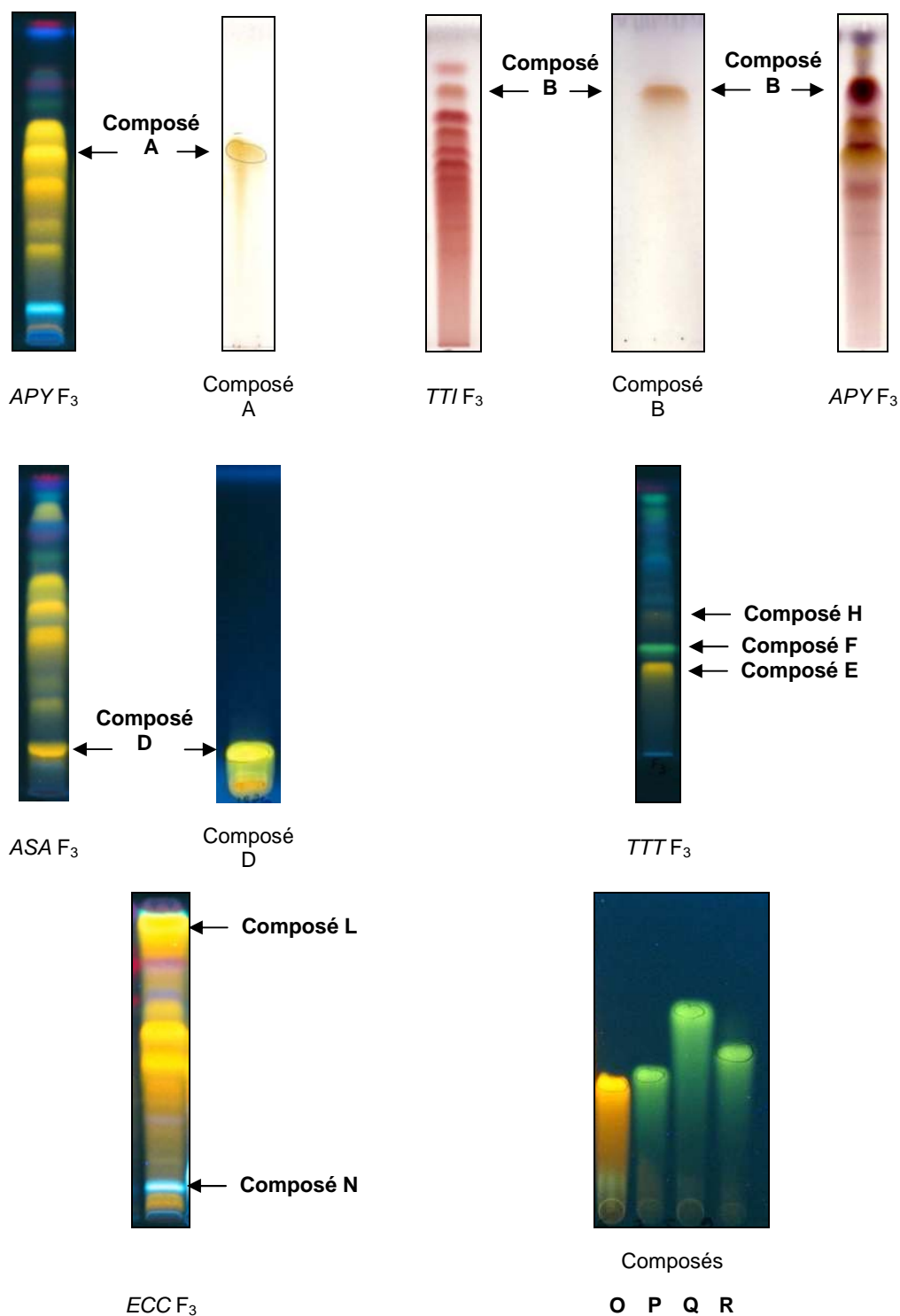
## **VII. ANNEXES**



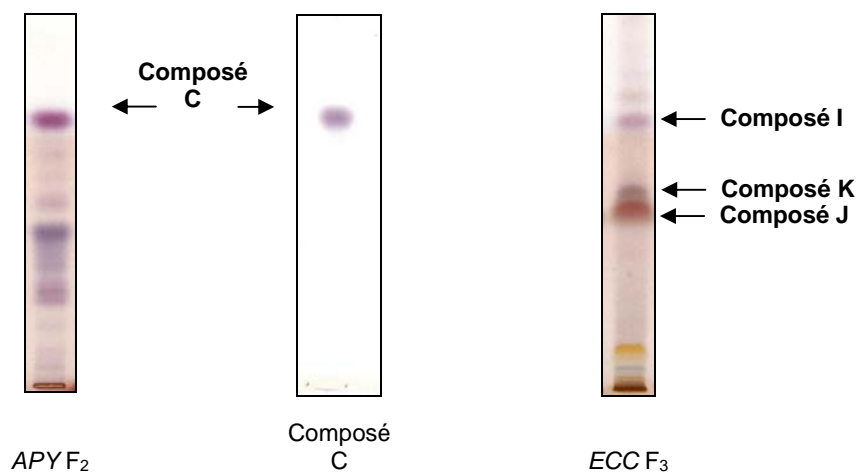
## Constantes physiques et données spectrales des composés isolés

### Chromatographies sur couche mince

Solvant de migration : AcOEt / MeOH / H<sub>2</sub>O (100 : 13.5 : 10)  
 Révélation : Réactif de Neu (observation 366 nm) ou Réactif à la vanilline sulfurique



Solvant de migration : Tol / AcOEt / MeOH (80 : 18 : 2)  
Révélation : Réactif à la vanilline sulfurique

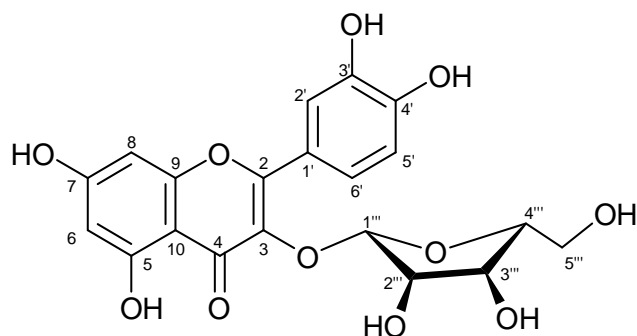


## Composé A

quercétine-3-O- $\alpha$ -arabinofuranoside $C_{20}H_{18}O_{11}$ 

masse : 434

poudre jaune

UV :  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 258, 352 nmIR :  $\nu_{\max}$  (KBr) 3350 (OH), 1650 (C=O), 1603 (cycle aromatique), 1200, 1110 (C-O)  $\text{cm}^{-1}$ ESI-MS (négatif)  $m/z$  (int. rel) : 433 (100), 301 (57), 300 (42), 271 (40), 255 (20), 243 (11), 227 (5)RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

position	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$
2	158.2	-
3	133.7	-
4	178.8	-
5	161.8	-
6	98.9	6.21 ( <i>d</i> , $J = 2.0$ Hz)
7	164.8	-
8	93.5	6.40 ( <i>d</i> , $J = 2.0$ Hz)
9	157.4	-
10	104.4	-
1'	121.9	-
2'	115.7	7.54 ( <i>d</i> , $J = 2.1$ Hz)
3'	145.1	-
4'	148.7	-
5'	115.3	6.92 ( <i>d</i> , $J = 8.3$ Hz)
6'	121.8	7.50 ( <i>dd</i> , $J = 8.3, 2.1$ Hz)
Ara		
1''	108.5	5.48 ( <i>d</i> , $J = 1.0$ Hz)
2''	82.1	4.35 ( <i>dd</i> , $J = 3.0, 1.0$ Hz)
3''	77.5	3.93 ( <i>dd</i> , $J = 5.0, 3.0$ Hz)
4''	86.8	3.89 m
5''a	61.4	3.52 ( <i>dd</i> , $J = 11.5, 4.5$ Hz)
5''b		3.48 ( <i>dd</i> , $J = 11.5, 3.6$ Hz)

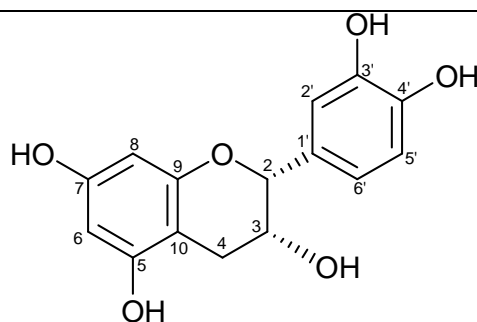
## Composés B (et G)

## (-)-épicatechine

 $C_{15}H_{14}O_6$ 

masse : 290

poudre brun-rougeâtre

 $[\alpha]_D - 55^\circ$  (c = 0,42 dans MeOH)UV :  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 226, 278 nmIR :  $\nu_{\max}$  (KBr) 3192 (OH), 1606 (cycles aromatiques), 1283, 1144 (C-O)  $\text{cm}^{-1}$ ESI-MS (négatif)  $m/z$  (int. rel): 289 (100), 244 (10), 221 (4)RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

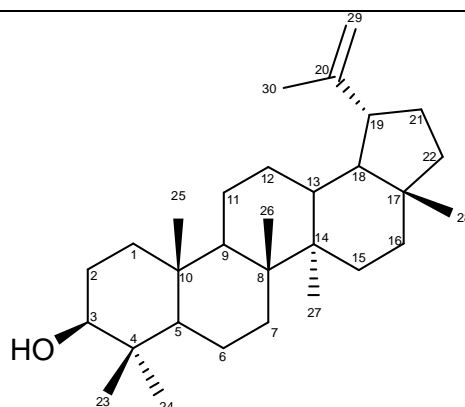
position	$\delta_C$	$\delta_H$
2	78.5	4.83 <i>brs</i>
3	66.0	4.19 ( <i>ddd</i> , $J = 4.5, 3.0, 1.5$ Hz)
4	27.9	2.88 ( <i>dd</i> , $J = 16.7, 4.5$ Hz) 2.75 ( <i>dd</i> , $J = 16.7, 3.0$ Hz)
5	156.3	-
6	95.0	5.95 ( <i>d</i> , $J = 2.3$ Hz)
7	156.6	-
8	94.5	5.93 ( <i>d</i> , $J = 2.3$ Hz)
9	156.0	-
10	98.7	-
1'	130.9	-
2'	118.0	6.99 ( <i>d</i> , $J = 2.0$ Hz)
3'	144.4	-
4'	144.6	-
5'	113.9	6.77 ( <i>d</i> , $J = 8.2$ Hz)
6'	114.5	6.81 ( <i>ddd</i> , $J = 8.2, 2.0, 0.6$ Hz)

## Composé C

(20)29-lupén-3 $\beta$ -ol ou lupéol $C_{30}H_{50}O$ 

masse : 426

poudre blanche

EI-MS  $m/z$  (int. rel) : 426 (34), 411 (12), 216 (100), 207 (66), 189 (91)IR :  $\nu_{\max}$  (KBr) 3440 (OH), 3070, 1631, 877 (méthylène terminal)  $\text{cm}^{-1}$ RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Position	$J_{\text{mod}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	$\text{CH}_2$	38.7	1.68 <i>m</i> , 0.91 <i>m</i>
2	$\text{CH}_2$	27.5	1.04 <i>m</i> , 1.61 <i>m</i>
3	$\text{CH}$	79.0	3.20 ( <i>dt</i> , $J = 11.3, 5.1$ Hz)
4	$\text{C}$	38.9	-
5	$\text{CH}$	55.3	0.70 ( <i>d</i> , $J = 8.9$ Hz)
6	$\text{CH}_2$	19.3	1.40 <i>m</i> , 1.51 <i>m</i>
7	$\text{CH}_2$	34.3	1.40 <i>m</i>
8	$\text{C}$	40.8	-
9	$\text{CH}$	50.5	1.28 <i>m</i>
10	$\text{C}$	37.2	-
11	$\text{CH}_2$	20.9	1.23 <i>m</i> , 1.42 <i>m</i>
12	$\text{CH}_2$	25.2	1.08 <i>m</i> , 1.69 <i>m</i>
13	$\text{CH}$	38.1	1.65 <i>m</i>
14	$\text{C}$	42.8	-
15	$\text{CH}_2$	27.4	1.04 <i>m</i> , 1.61 <i>m</i>
16	$\text{CH}_2$	35.6	1.45 <i>m</i>
17	$\text{C}$	43.0	-
18	$\text{CH}$	48.3	1.37 <i>m</i>
19	$\text{CH}$	47.9	2.40 ( <i>dd</i> , $J = 11.0, 5.6$ Hz)
20	$\text{C}$	151.0	-
21	$\text{CH}_2$	29.9	1.31 <i>m</i> , 1.93 <i>m</i>
22	$\text{CH}_2$	40.0	1.20 <i>m</i> , 1.40 <i>m</i>
23	$\text{CH}_3$	28.0	0.98 <i>s</i>
24	$\text{CH}_3$	15.4	0.77 <i>s</i>
25	$\text{CH}_3$	16.1	0.84 <i>s</i>
26	$\text{CH}_3$	16.0	1.05 <i>s</i>
27	$\text{CH}_3$	14.6	0.96 <i>s</i>
28	$\text{CH}_3$	18.0	0.81 <i>s</i>
29	$\text{CH}_2$	109.3	4.71 ( <i>dd</i> , $J = 2.5, 0.6$ Hz), 4.58 ( <i>dd</i> , $J = 2.5, 1.3$ Hz)
30	$\text{CH}_3$	19.3	1.70 ( <i>dd</i> , $J = 1.3, 0.6$ Hz)

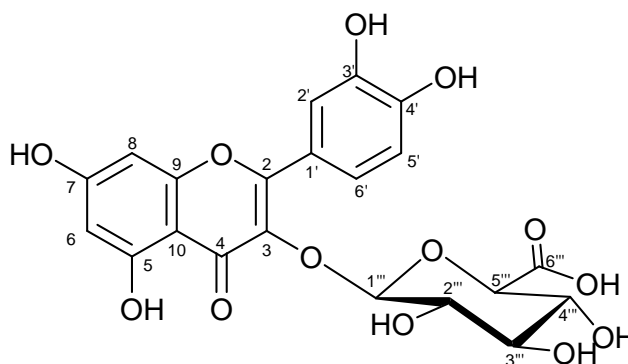
Composé *D*quercétine-3-*O*- $\beta$ -glucuronopyranoside

ou miquélianine

 $C_{21}H_{18}O_{13}$ 

masse : 478

poudre jaune

UV :  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 254, 346 nmESI-MS  $m/z$  : 477 (100), 301 (85)RMN (400 MHz,  $CD_3OD$ )

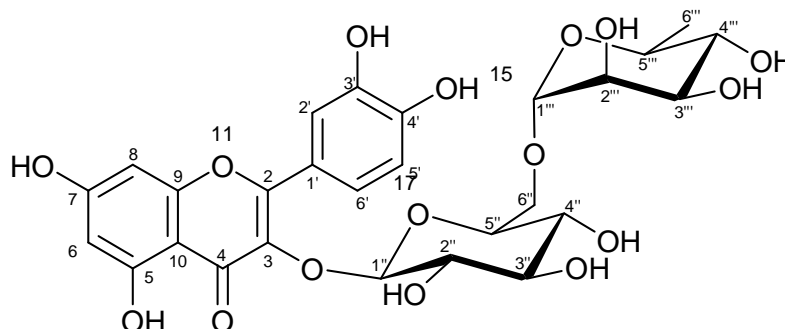
Position	$\delta_C$	$\delta_H$
2	157.7	-
3	134.1	-
4	178.0	-
5	161.7	-
6	98.5	6.42 ( <i>d</i> , $J = 2.0$ Hz)
7	164.6	-
8	93.3	6.23 ( <i>d</i> , $J = 2.0$ Hz)
9	157.1	-
10	104.3	-
1'	121.5	-
2'	116.1	7.72 ( <i>d</i> , $J = 1.9$ Hz)
3'	148.5	-
4'	144.5	-
5'	114.7	6.87 ( <i>d</i> , $J = 8.4$ Hz)
6'	121.8	7.60 ( <i>dd</i> , $J = 8.4, 1.9$ Hz)
gluc		
1''	102.9	5.38 ( <i>d</i> , $J = 7.4$ Hz)
2''	74.0	3.56 <i>m</i>
3''	76.4	3.50 <i>m</i>
4''	72.0	3.61 <i>m</i>
5''	76.4	3.78 <i>m</i>
6	173.2	-

## Composé E

Rutine ou  
quercétine-3-O- $\beta$ -rutinoside $C_{27}H_{30}O_{16}$ 

masse : 610

poudre jaune

UV :  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 258, 352 nmIR :  $\nu_{\max}$  (KBr) 3347 (OH), 3372, 3256, 1652 (C=O), 1603 (cycle aromatique), 1200 (C-O)  $\text{cm}^{-1}$ ESI-MS (négatif)  $m/z$  (int. rel): 609 (100), 300 (57), 301 (42), 271 (40), 255 (20), 179 (11), 151 (5),  
(positif)  $m/z$  (int. rel) : 645 (10), 488 (21), 326 (20), 332 (100), 325 (50)RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

Position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	Corrélations HMBC
2	157.3	-	H-2', H-6'
3	134.0	-	H-1 <sub>Glu</sub>
4	178.0	-	
5	161.9	-	
6	99.4	6.20 ( <i>d</i> , $J = 1.8$ Hz)	C-10
7	164.8	-	
8	94.3	6.39 ( <i>d</i> , $J = 1.8$ Hz)	
9	157.1	-	
10	104.6	-	H-6
1'	121.8	-	
2'	116.9	7.56 <i>s</i>	C-3', C-2
3'	145.4	-	H-2'
4'	149.1	-	H-6'
5'	115.9	6.84 ( <i>d</i> , $J = 8.1$ Hz)	
6'	122.3	7.54 ( <i>d</i> , $J = 8.0$ Hz)	C-4'
Glu			
1''	101.9	5.34 ( <i>d</i> , $J = 7.4$ Hz)	C-3, C-2 <sub>Glu</sub>
2''	74.7	3.23 <i>m</i>	C-3 <sub>Glu</sub>
3''	77.1	3.23 <i>m</i>	C-2 <sub>Glu</sub> , C-4 <sub>Glu</sub>
4''	70.7	3.07 <i>m</i>	C-3 <sub>Glu</sub> , C-5 <sub>Glu</sub> , C-6 <sub>Glu</sub>
5''	76.6	3.27 <i>m</i>	C-4 <sub>Glu</sub> , C-6 <sub>Glu</sub>
6''	67.6	3.30 <i>m</i>	
6''	67.6	3,71 ( <i>d</i> , $J = 10,3$ Hz)	C-1 <sub>Rha</sub>
Rha			
1'''	101.4	4,38 ( <i>d</i> , $J = 1,3$ Hz)	C-6 <sub>Glu</sub>
2'''	71.0	3.39 <i>m</i>	
3'''	71.2	3.29 <i>m</i>	
4'''	72.5	3.09 <i>m</i>	C-3 <sub>Rha</sub> , C-5 <sub>Rha</sub> , C-6 <sub>Rha</sub>
5'''	68.9	3.28 <i>m</i>	C-3 <sub>Rha</sub> , C-4 <sub>Rha</sub> , C-6 <sub>Rha</sub>
6'''	18.4	0,99 ( <i>d</i> , $J = 6,2$ Hz)	C-5 <sub>Rha</sub>

## Composé F

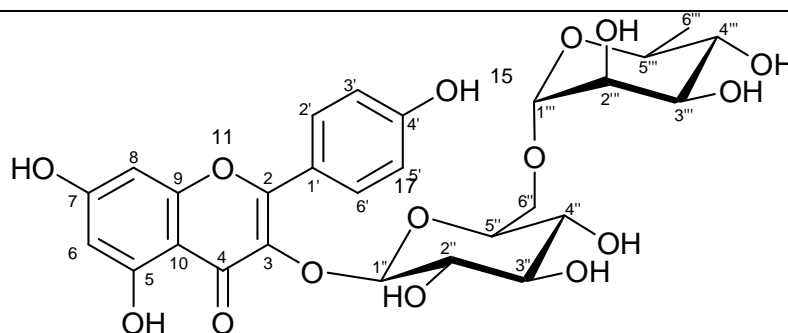
kaempférol-3-O- $\beta$ -rutinoside ou

nicotiflorine

 $C_{27}H_{30}O_{15}$ 

masse : 594

poudre jaune

UV :  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 258, 353 nmIR :  $\nu_{\max}$  (KBr) 3352 (OH), 1647 (C=O), 1600 (cycle aromatique), 1201 (C-O)  $\text{cm}^{-1}$ ESI-MS (négatif)  $m/z$  (int. rel): 593 (10), 284 (100), 285 (100), 227 (20), (positif)  $m/z$  (int. rel) : 617 (100), 471 (12), 331 (97), 308 (70), 309 (20)

RMN (fréquence MHz, solvant)

Position	$\delta_C$	$\delta_H$	Corrélations HMBC
2	157.5	-	C-2', C-6'
3	133.9	-	C-1 <sub>Glu</sub>
4	178.0	-	
5	161.8	-	
6	99.6	6.41 s	
7	164.9	-	C-6
8	94.4	6.20 s	
9	157.2	-	C-8
10	104.5	-	C-8, C-6
1'	121.5	-	C-3', C-5'
2'	131.5	7.98 (d, $J = 8.8$ Hz)	C-6'
3'	115.8	6.88 (d, $J = 8.7$ Hz)	
4'	160.6	-	C-2', C-6', C-3', C-5'
5'	115.8	6.88 (d, $J = 8.7$ Hz)	
6'	131.5	7.98 (d, $J = 8.8$ Hz)	C-2'
Glu			
1''	102.0	5.30 (d, $J = 7.4$ Hz)	C-2 <sub>Glu</sub>
2''	74.8	3.23 m	C-3 <sub>Glu</sub>
3''	77.0	3.23 m	C-4 <sub>Glu</sub> , C-2 <sub>Glu</sub>
4''	70.6	3.07 m	C-6 <sub>Glu</sub> , C-3 <sub>Glu</sub> , C-5 <sub>Glu</sub>
5''	76.4	3.27 m	C-4 <sub>Glu</sub> , C-6 <sub>Glu</sub>
6''	67.5	3.07 (t, $J = 9.2$ Hz)	
6''		3.71 (d, $J = 10.3$ Hz)	
Rha			
1'''	101.4	4.38 s	C-6 <sub>Glu</sub>
2'''	70.9	3.39 m	C-4 <sub>Rha</sub>
3'''	71.3	3.29 m	C-2 <sub>Rha</sub> , C-5 <sub>Rha</sub>
4'''	72.5	3.09 m	C-6 <sub>Rha</sub> , C-5 <sub>Rha</sub> , C-3 <sub>Rha</sub>
5'''	68.9	3.28 m	C-4 <sub>Rha</sub> , C-4 <sub>Rha</sub> , C-6 <sub>Rha</sub>
6'''	18.4	0.98 (d, $J = 6.2$ Hz)	C-4 <sub>Rha</sub>

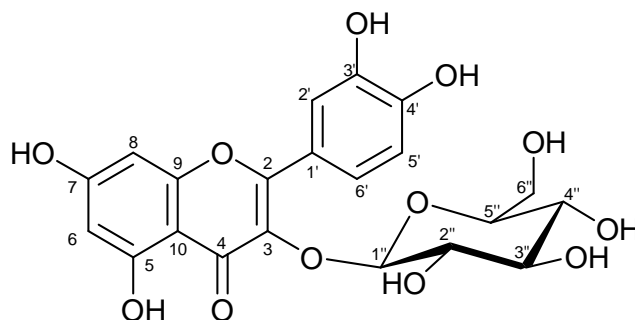


## Composé H

quercétine-3-O- $\alpha$ -glucopyranoside ou  
isoquercitrine $C_{21}H_{20}O_{12}$ 

masse : 464

Poudre jaune

UV :  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 253, 349 nmIR :  $\nu_{\max}$  (KBr) 3747 (OH), 3370, 2356, 1650 (C=O), 1609 (cycle aromatique), 1185 (C-O)  $\text{cm}^{-1}$ ESI-MS (négatif)  $m/z$  (int. rel): 300 (100), 271 (80), 255 (20), 483 (20)RMN (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

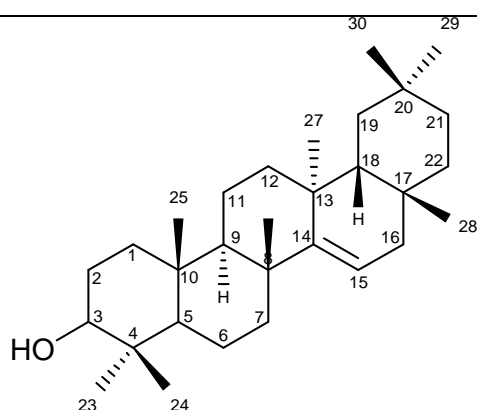
position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
2	157.6	-
3	134.2	-
4	178.1	-
5	161.7	-
6	98.5	6.21 ( <i>d</i> , $J = 2.0$ Hz)
7	164.7	-
8	93.3	6.40 ( <i>d</i> , $J = 2.0$ Hz)
9	157.1	-
10	104.3	-
1'	121.7	-
2'	116.2	7.54 ( <i>d</i> , $J = 2.1$ Hz)
3'	144.5	-
4'	148.5	-
5'	114.6	6.92 ( <i>d</i> , $J = 8.3$ Hz)
6'	121.8	7.50 ( <i>dd</i> , $J = 2.1$ , $J = 8.3$ Hz)
Glu		
1''	102.2	5.12 ( <i>d</i> , $J = 1.0$ Hz)
2''	77.0	3.62 <i>m</i>
3''	76.7	3.53 <i>m</i>
4''	74.3	3.41 <i>m</i>
5''	69.8	3.39 <i>m</i>
6''a		3.48 <i>m</i>
6''b	61.2	3.34 <i>m</i>

## Composé I

14-taraxeren-3 $\beta$ -ol ou taraxérol $C_{30}H_{50}O$ 

masse : 426

poudre blanche

EI-MS  $m/z$  (int. rel) : 204 (100), 218 (41), 189 (36), 287 (27), 302 (26), 426 (12)IR :  $\nu_{\max}$  (KBr) 3550, 2960, 1450, 1375, 1158, 1065, 1050  $\text{cm}^{-1}$ RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Position	Jmod	$\delta_c$	$\delta_H$
1	CH <sub>2</sub>	37.7	1.61 <i>m</i>
2	CH <sub>2</sub>	27.1	1.51 <i>m</i> , 1.54 <i>m</i>
3	CHOH	79.1	3.19 ( <i>dd</i> , $J = 11.2, 4.6$ Hz)
4	C	38.7	-
5	CH	55.5	0.78 ( <i>d</i> , $J = 13.0$ Hz)
6	CH <sub>2</sub>	18.8	1.64 <i>m</i> , 1.49 <i>m</i>
7	CH <sub>2</sub>	41.2	1.36 <i>m</i> , 2.05 ( <i>dt</i> , $J = 12.8, 3.1$ Hz)
8	C	39.0	-
9	CH	49.3	1.43 <i>m</i>
10	C	38.0	-
11	CH <sub>2</sub>	17.5	1.51 <i>m</i> , 1.65 <i>m</i>
12	CH <sub>2</sub>	35.1	1.01 <i>m</i> , 1.36 <i>m</i>
13	C	37.6	-
14	C	158.1	-
15	CH	116.9	5.53 ( <i>dd</i> , $J = 8.2, 3.2$ Hz)
16	CH <sub>2</sub>	37.7	1.61 <i>m</i> , 1.91 ( <i>dd</i> , $J = 14.9, 3.1$ Hz)
17	C	35.8	-
18	CH	48.7	0.97 <i>m</i>
19	CH <sub>2</sub>	36.7	0.99 <i>m</i> , 1.33 <i>m</i>
20	C	28.8	-
21	CH <sub>2</sub>	33.7	1.63 <i>m</i>
22	CH <sub>2</sub>	33.1	1.34 <i>m</i> , 1.55 <i>m</i>
23	CH <sub>3</sub>	28.0	1.0 <i>s</i>
24	CH <sub>3</sub>	15.5	0.82 <i>s</i>
25	CH <sub>3</sub>	15.4	0.94 <i>s</i>
26	CH <sub>3</sub>	25.9	1.12 <i>s</i>
27	CH <sub>3</sub>	29.9	0.92 <i>s</i>
28	CH <sub>3</sub>	29.8	0.84 <i>s</i>
29	CH <sub>3</sub>	33.4	0.97 <i>s</i>
30	CH <sub>3</sub>	21.3	0.92 <i>s</i>

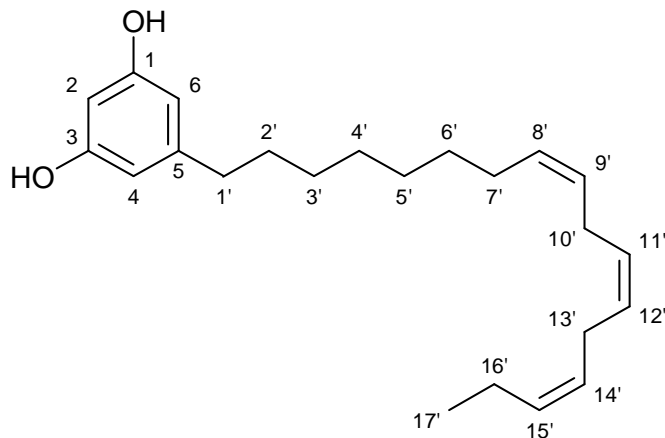
## Composé J

## 5-(8'(Z),11'(Z),14'(Z)-heptadécatrienyl)résorcinol

 $C_{23}H_{34}O_2$ 

masse : 342

huile rougeâtre

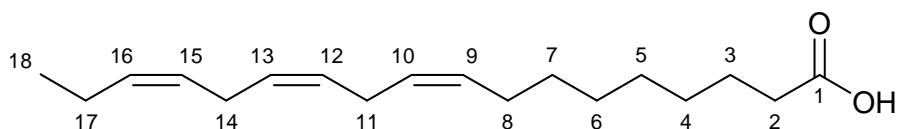
IR :  $\nu_{\max}$  (KBr) 3499, 3012, 2925, 2852, 1594, 1278, 732  $\text{cm}^{-1}$ ESI-MS (négatif)  $m/z$  (int. rel): 341 (100), 135 (54), 123 (50)RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

position	$J_{\text{mod}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	C	156.6	-
2	CH	100.1	6.19 ( <i>t</i> , $J = 2.2$ Hz)
3	C	156.6	-
4	CH	108.0	6.26 ( <i>d</i> , $J = 2.2$ Hz)
5	C	146.1	-
6	CH	108.0	6.26 ( <i>d</i> , $J = 2.2$ Hz)
1'	$\text{CH}_2$	35.8	2.50 ( <i>t</i> , $J = 7.3$ Hz)
2'	$\text{CH}_2$	31.0	1.59 ( <i>q</i> , $J = 7.3$ Hz)
3'	$\text{CH}_2$	29.7*	1.33 <i>m</i>
4'	$\text{CH}_2$	29.4*	1.33 <i>m</i>
5'	$\text{CH}_2$	29.3*	1.33 <i>m</i>
6'	$\text{CH}_2$	29.3*	1.59 <i>m</i>
7'	$\text{CH}_2$	27.3	2.08 <i>m</i>
8'	CH	130.4	5.38 <i>m</i>
9'	CH	127.7	5.38 <i>m</i>
10'	$\text{CH}_2$	25.7	2.83 ( <i>t</i> , $J = 5.4$ Hz)
11'	CH	128.3	5.38 <i>m</i>
12'	CH	128.3	5.38 <i>m</i>
13'	$\text{CH}_2$	25.6	2.83 ( <i>t</i> , $J = 5.4$ Hz)
14'	CH	127.2	5.38 <i>m</i>
15'	CH	132.0	5.38 <i>m</i>
16'	$\text{CH}_2$	20.6	2.09 <i>m</i>
17'	$\text{CH}_3$	14.3	1.00 ( <i>t</i> , $J = 7.5$ Hz)
* Valeurs interchangeables			

**Composé K****9(Z),12(Z),15(Z)-octadecatriénoïque****ou acide linoléique** $C_{18}H_{30}O_2$ 

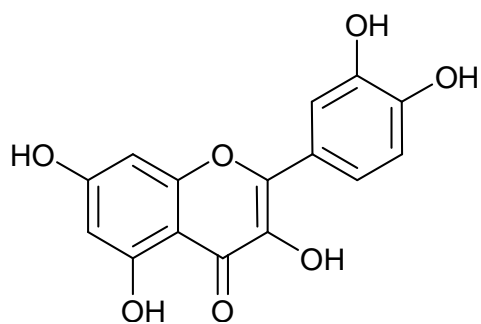
masse : 278

huileux

**Composé L****quercétine** $C_{15}H_{10}O_7$ 

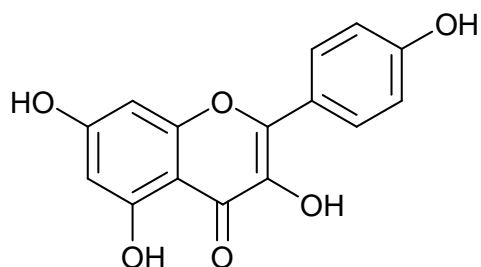
Masse : 302

Poudre jaune

UV :  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 245, 360 nmESI-MS (négatif)  $m/z$  : 301 (71), 271 (100), 255 (42), 243 (15), 227 (10)**Composé M****kaempférol** $C_{15}H_{10}O_6$ 

Masse : 286

Poudre jaune

UV :  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 265, 365 nmESI-MS (négatif)  $m/z$  (int. rel): 285 (92), 255 (100), 227 (76), 213 (10)

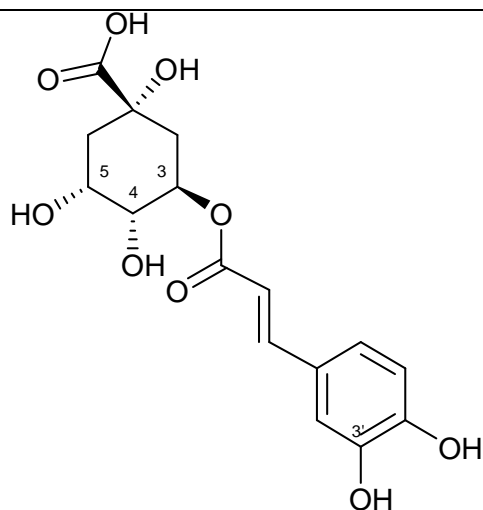
## Composé N

acide 5-O-cafféoylquinique ou

acide chlorogénique

 $C_{16}H_{18}O_9$ 

masse : 354

UV :  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 222, 216, sh290 nmESI-MS  $m/z$  : 353, 191 (12), 173 (50), 126 (100), 111 (25), 93 (62), 85 (87)

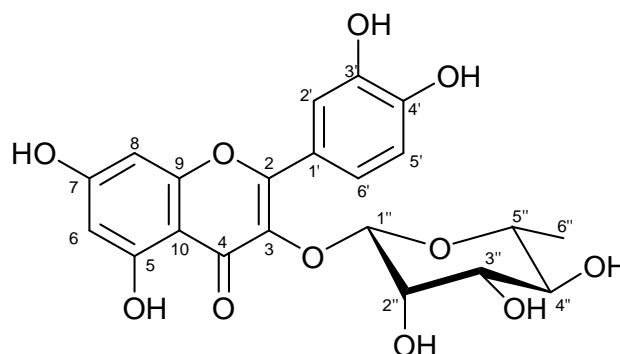
## Composé O

quercétine-3-O- $\alpha$ -rhamnopyranoside ou  
quercitrine

$C_{21}H_{20}O_{11}$

masse : 448

poudre jaune



UV :  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 254, 356 nm

ESI-MS  $m/z$  : 447 (40), 301 (65), 300 (90), 271 (100), 255 (59)

IR :  $\nu_{\max}$  (KBr) 3450 (OH), 1660 (C=O), 1605 (cycle aromatique), 1112 (C-O)  $\text{cm}^{-1}$

RMN (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

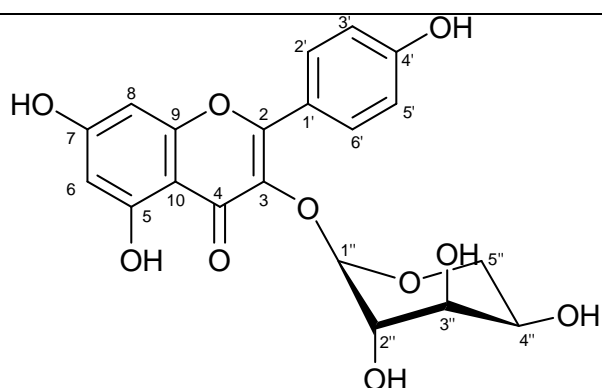
position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
2	158.9	-
3	136.2	-
4	179.3	-
5	163.0	-
6	100.0	6.22 (d, $J = 2.1$ Hz)
7	166.1	-
8	95.0	6.40 (d, $J = 2.1$ Hz)
9	158.4	-
10	105.7	-
1'	122.9	-
2'	117.5	7.31 (d, $J = 2.0$ Hz)
3'	149.9	-
4'	145.9	-
5'	123.4	6.95 (d, $J = 8.0$ Hz)
6'	116.0	7.22 (d, $J = 8.0, 2.0$ Hz)
Rha		
1''	102.1	5.38 (d, $J = 1.8$ Hz)
2''	70.5	4.22 (dd, $J = 3.2, 1.8$ Hz)
3''	70.7	3.71 (dd, $J = 9.2, 3.2$ Hz)
4''	71.8	3.33 m
5''	70.7	3.33 m
6''	16.3	0.92 (d, $J = 5.5$ Hz)

## Composé P

kaempférol-3-O- $\beta$ -arabinopyranoside $C_{20}H_{18}O_{10}$ 

masse : 418

poudre jaune

UV :  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 262, 341 nmESI-MS (négatif)  $m/z$  : 417 (100), 284 (55), 285 (22), 255 (45), 227 (20)IR :  $\nu_{\max}$  (KBr) 3350 (OH), 1650 (C=O), 1603 (cycle aromatique), 1200, 1110 (C-O)  $\text{cm}^{-1}$ RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
2	157.3	-
3	134.1	-
4	178.0	-
5	161.6	-
6	98.9	6.21 ( <i>d</i> , $J = 2.0$ Hz)
7	165.7	-
8	93.6	6.40 ( <i>d</i> , $J = 2.0$ Hz)
9	157.2	-
10	103.9	-
1'	121.2	-
2'	130.8	8.09 ( <i>d</i> , $J = 9.0$ Hz)
3'	114.8	6.91 ( <i>d</i> , $J = 9.0$ Hz)
4'	160.3	-
5'	114.8	6.91 ( <i>d</i> , $J = 9.0$ Hz)
6'	130.8	8.09 ( <i>d</i> , $J = 9.0$ Hz)
Ara		
1''	103.0	5.15 ( <i>d</i> , $J = 6.4$ Hz)
2''	71.3	3.91 ( <i>dd</i> , $J = 8.2, 6.4$ Hz)
3''	72.6	3.65 ( <i>dd</i> , $J = 8.2, 3.2$ Hz)
4''	67.6	3.81 <i>brs</i>
5''	65.4	3.43 ( <i>dd</i> , $J = 13.9, 3.4$ Hz) 3.78 <i>m</i>

## Composé Q

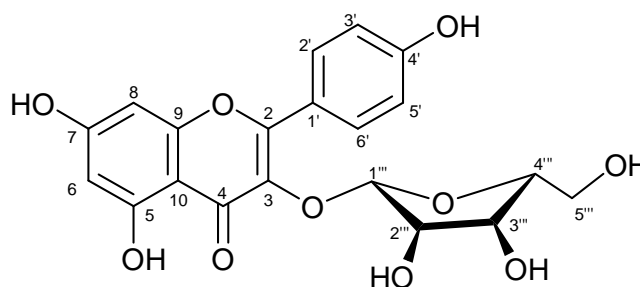
kaempférol-3-O- $\alpha$ -arabinofuranoside

ou euglanine

 $C_{20}H_{18}O_{10}$ 

Masse : 418

Poudre jaune

UV :  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 262, 341 nmESI-MS (négatif)  $m/z$  : 417 (90), 284 (42), 285 (100), 255 (26), 227 (8)IR :  $\nu_{\max}$  (KBr) 3352 (OH), 1655 (C=O), 1605 (cycle aromatique), 1205 (C-O), 1085  $\text{cm}^{-1}$ RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
2	157.9	-
3	133.5	-
4	178.5	-
5	161.7	-
6	98.6	6.23 (d, $J = 2.2$ Hz)
7	165.2	-
8	93.5	6.42 (d, $J = 2.2$ Hz)
9	157.2	-
10	104.1	-
1'	121.4	-
2'	129.3	7.99 (d, $J = 9.1$ Hz)
3'	115.1	6.95 (d, $J = 9.1$ Hz)
4'	160.2	-
5'	115.1	6.95 (d, $J = 9.1$ Hz)
6'	129.3	7.99 (d, $J = 9.1$ Hz)
Ara		
1''	108.2	5.51 (d, $J = 0.4$ Hz)
2''	82.0	4.34 (dd, $J = 3.0, 1.0$ Hz)
3''	77.2	3.93 (dd, $J = 5.0, 3.0$ Hz)
4''	86.6	3.82 (dd, $J = 9.2, 4.6$ Hz)
5''	61.1	3.50 (d, $J = 3.9$ Hz)



## Composé R

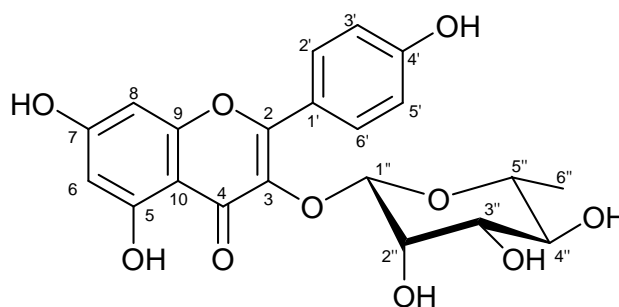
kaempférol-3-O- $\alpha$ -rhamnopyranoside

ou afzéline

formule brute

masse

forme

UV :  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 262, 341 nmESI-MS (négatif)  $m/z$  : 431 (100), 284 (33), 285 (55)IR :  $\nu_{\max}$  (KBr) 3348 (OH), 3372, 2356, 1652 (C=O), 1612, 1603 (cycle aromatique), 1514, 1200 (C-O)  $\text{cm}^{-1}$ RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
2	157.8	-
3	134.8	-
4	178.2	-
5	161.8	-
6	98.6	6.22 ( <i>d</i> , $J = 2.1$ Hz)
7	165.1	-
8	93.5	6.40 ( <i>d</i> , $J = 2.1$ Hz)
9	157.2	-
10	104.4	-
1'	121.2	-
2'	130.5	7.79 ( <i>d</i> , $J = 8.8$ Hz)
3'	115.1	6.96 ( <i>d</i> , $J = 8.8$ Hz)
4'	160.2	-
5'	115.1	6.96 ( <i>d</i> , $J = 8.8$ Hz)
6'	130.5	7.79 ( <i>d</i> , $J = 8.8$ Hz)
Rha		
1''	102.1	5.40 ( <i>d</i> , $J = 1.6$ Hz)
2''	70.5	4.24 ( <i>dd</i> , $J = 3.3, 1.6$ Hz)
3''	70.7	3.73 ( <i>dd</i> , $J = 9.3, 3.3$ Hz)
4''	71.8	3.35 <i>m</i>
5''	70.7	3.35 <i>m</i>
6''	16.3	0.94 ( <i>d</i> , $J = 5.6$ Hz)

---

## ***Publication***

**A. Lhuillier, N. Fabre, F. Moyano, N. Martins, C. Claparols, I. Fourasté and C. Moulis (2007)**  
**Comparison of flavonoid profiles of *Agauria salicifolia* (Ericaceae) by liquid chromatography-UV diode array detection–electrospray ionisation mass spectrometry.**  
*Journal of Chromatography A*. In Press, doi:10.1016/j.chroma.2007.03.038

## ***Poster***

**A. Lhuillier, F. Moyano, N. Martins, C. Claparols, N. Fabre and C. Moulis. Analysis of flavonoid profiles of *Agauria salicifolia* (Ericaceae) by LC-MS.** 23rd LC/MS Montreux symposium, 8-11 novembre 2006, Montreux, Switzerland.



## Comparison of flavonoid profiles of *Agauria salicifolia* (Ericaceae) by liquid chromatography–UV diode array detection–electrospray ionisation mass spectrometry

Amélie Lhuillier<sup>a</sup>, Nicolas Fabre<sup>a,\*</sup>, Florian Moyano<sup>b</sup>, Nathalie Martins<sup>b</sup>, Catherine Claparols<sup>b</sup>, Isabelle Fourasté<sup>a</sup>, Claude Moulis<sup>a</sup>

<sup>a</sup> UMR-152 IRD-UPS Laboratoire Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université Paul-Sabatier, F-31062 Toulouse cedex 09, France  
<sup>b</sup> Service Commun de Spectrométrie de Masse, Université Paul-Sabatier, F-31062 Toulouse cedex 04, France

### Abstract

Liquid chromatography (LC) coupled to negative electrospray ionisation (ESI) tandem mass spectrometry (MS/MS) was used for the rapid and sensitive identification of flavonoid compounds in *Agauria salicifolia*. The leaf flavonoid content in individual of *A. salicifolia* originating from population with contrasted ecogeographical situation and morphological characteristics was found to be variable qualitatively and highly variable quantitatively. Identification of the compounds was carried out by interpretation of UV, MS and MS/MS spectra. Fourteen flavonoids were identified, all of which had not previously been reported in *Agauria* spp. Two flavonol-*O*-glucuronides were found to differentiate the two populations.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** *Agauria salicifolia*; Flavonoids; Chemotaxonomy; Mass spectrometry; Flavonol *O*-glycosides; HPLC-DAD/MS/MS; Ericaceae

### 1. Introduction

*Agauria salicifolia* Hook.f. ex Oliver (Ericaceae) is an arborescent shrub common to forest countries of Madagascar, Mascareigne Islands and tropical Africa. This species is known for its high polymorphism [1]. Although many species and sub-species have been described in the genus *Agauria*, some authors are in favour of the existence of only one very polymorph species *A. salicifolia* [2]. Although leaves of all forms are known for ages to be very toxic for humans [3] or animal which eat them, some forms which might be less toxic than others are used by traditional practitioners against ulcerous wounds, as depurative, as antivenereals or to treat scabies [1,4]. Indeed *Agauria* spp. contain several kinds of active principles such as diterpenoids (grayanotoxins I, II and III) and triterpenoids (morolic acid and derivatives) [4–8]. The aim of this work was to evaluate the possibility of development of an alternative identification of the

different polymorphic forms of *A. salicifolia* based on chemical differences.

Flavonoids are very common and wide spread secondary plant metabolites. They have a wide range of biological and physiological activities mainly based on their antioxidant properties. The near ubiquitous distribution of flavonoids in green plants, their relative chemical stability and the strong tendency for related plants to produce similar types of flavonoids have made them particularly useful in plant classification. Flavonoids compounds have been used successfully as taxonomic markers to elucidate the organisation of genetic variability as well as the phylogenetic trends in several species complexes [9,10]. The present work investigated variation in flavonoid profiles obtained from individuals belonging to two populations of *A. salicifolia* differing in their morphology and ecology. For this purpose, liquid chromatography/mass spectrometry coupling (LC/MS) was applied on flavonoid extracts of the two plants to obtain information for the structural characterisation of flavonoids [11,12]. Furthermore, flavonoids found in the two populations studied were tentatively employed as taxonomic markers and tested for their value in population discrimination.

\* Corresponding author. Tel.: +33 562 256 848; fax: +33 561 554 330.  
 E-mail address: [nfabee@cict.fr](mailto:nfabee@cict.fr) (N. Fabre).

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals

Methanol, acetonitrile (both HPLC grade), ethyl acetate and hexane were from SDS (Peypin, France), formic acid (analytical grade) was from Prolabo (Fontenay sous Bois, France). Ultrapure water (Milli-Q, Waters, Milford, MA, USA) was used. Flavonoid standards: quercetin, quercetin-3-O-galactoside (hyperoside), quercetin-3-O-glucoside (isoquercitrin) and kaempferol-3-O-arabinofuranoside, kaempferol-3-O-arabinopyranoside and kaempferol-3-O-rhamnoside were isolated from other Ericaceae in our laboratory and identified by NMR experiments. The standards were prepared as stock solutions at 10 g/L in methanol. Working standard solutions (1 mg/mL) were made by diluting the stock solutions with the LC mobile phase (initial conditions).

### 2.2. Plant material

The leaves of two populations of *A. salicifolia* were collected in Madagascar in 2003. These populations were originated from contrasted ecogeographical situations (high altitude savannah and slope of mountain area, respectively for populations 1 and 2) in the region of Moramanga. Populations 1 and 2 had strong morphological differences in particular in size and shape of leaves.

### 2.3. Samples preparation

Dried leaves of *A. salicifolia* (1000 g) ground into a fine powder were extracted with ethanol–water (7:3, v/v) by agitated maceration at 50 °C. The ethanolic extract was evaporated to dryness under partial vacuum at 40 °C and then dissolved in ethanol–water (7:3, v/v). This solution (500 mL) was extracted with hexane three times (200 mL each) to remove lipid substances. This aqueous fraction was concentrated again under partial vacuum at 40 °C, dissolved in water (500 mL) and partitioned with ethyl acetate three times (200 mL each) affording a water soluble fraction and an ethyl acetate soluble fraction. This fraction (EA) was taken to dryness (~15 g). A precipitation step adapted from [13] was carried out to eliminate procyanidols. For this purpose, EA (5 g) was diluted in methanol (8 mL). Chloroform (920 mL) was added and the mixture was kept at 4 °C for 2 h. The precipitate formed (containing procyanidol polymers) was collected by filtration on glass filters. The filters were eliminated while the filtrate was evaporated and dissolved in minimum methanol. This methanolic solution was fractionated by gel filtration on Sephadex LH-20 (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) column eluted with 100% methanol. Fractionation was monitored by thin-layer chromatography on silica gel 60 F-254 (Merck, Darmstadt, Germany) with visualisation under UV (254 and 365 nm) and by spraying Neu reagent [14] (specific reagent for phenolic acid and flavonoids). Three final fractions (A, B and C) were obtained and fraction B (3 mg/mL) was analysed by HPLC coupled to diode-array detection (DAD–UV) and liquid chromatography with electrospray ionisation

mass spectrometry (LC–ESI–MS) to determine the flavonoid composition.

### 2.4. Analytical HPLC conditions

LC analyses were carried out in a Perkin–Elmer series 200 HPLC system (Perkin–Elmer, Concord, ON, Canada). It consisted of a quaternary pump (PE series 200), an autosampler (PE series 200) and a UV detector (PE 785 A). A Symmetry C18 (75 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) column (Waters) was used for the separation of flavonoids. The mobile phase consisted of two solvents: water–formic acid (0.1%) (A) and acetonitrile (B). Separations were performed at room temperature by solvent gradient elution at a flow-rate of 0.7 mL min<sup>-1</sup>: 13% B during 35 min, 13–20% B in 2 min, 20% B during 8 min, 20–100% B in 2 min and then return to the initial conditions (13% B) in 1 min to re-equilibrate the column prior to another run. The injection volume ranged 20–100 μL depending on the compound and extract assayed. UV spectral data from all peaks were accumulated in the range 240–400 nm and chromatograms were recorded at 260 nm. MS spectra were obtained with a triple quadrupole spectrometer Sciex API 365 (Perkin–Elmer, Concord, Canada) equipped with an electrospray ionisation interface and controlled by Analyst software (version 1.3.1) with the following settings: nebulizer gas (N<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>), 8 (arbitrary units); curtain gas (N<sub>2</sub>), 12 (arbitrary units); focusing potential (FP), –310 V; entrance potential, –10 V; drying gas (N<sub>2</sub>), heated to 500 °C. The declustering potential (DP) was –80 V and the collision energy (CE), –30 V. Mass spectrometry data were acquired in the negative ionisation mode, providing deprotonated molecular ions.

### 2.5. LC/UV/ESI–MS/MS analyses

The full scan mass acquisition was performed by scanning from *m/z* 100 up to 700. MS/MS product ions were produced by collision-induced dissociation (CID) of the selected precursor ions in the collision cell of the triple-quadrupole mass spectrometer and analysed using the second analyser of the instrument. Different MS/MS experiments, neutral loss scan, product ion scan and precursor ion scan of selected molecules were carried out to confirm the structure of the compounds previously identified by full scan mode.

Table 1 shows the most frequent ions which characterize the fragmentation of the compounds of the extract. Other ions were found but they have not been included due to their lack of significance on the MS behaviour ions. The flavonoid fragment ions can be designated according to the classical nomenclature proposed by Ma et al. [15]. For free aglycones, the <sup>i</sup>/<sub>j</sub>A<sup>–</sup> and <sup>i</sup>/<sub>j</sub>B<sup>–</sup> labels refer to the fragments containing intact A- and B-rings, respectively, in which the superscripts *i* and *j* indicate the C-ring bonds that have been broken (Fig. 1). For conjugated aglycones, Y<sub>0</sub><sup>–</sup> is used to designate the aglycone fragment [M–H–glycoside]<sup>–</sup>.

### 2.6. Preparative HPLC

The preparative isolation of compound 2–4 and 1–6 was performed on a Merck–Hitachi HPLC system consist-



Table 1  
LC-ESI-MS/MS data of flavonoids identified in the populations 1 and 2 of *Agauria salicifolia*

Compound	Peak	<i>R<sub>t</sub></i> (min)	MW	Ion full scan MS		MS/MS experiments		
				[M-H] <sup>−</sup>	Fragments <sup>a</sup>	Neutral loss scan	Precursor ion scan	Product ion scan <sup>b</sup>
Population 1								
Quercetin-3- <i>O</i> -galactoside	1-1	22.3	464	463	300, 271, 255, 301	162	301	–
Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside	1-2	25.5	464	463	300, 301	162	301	151, 273, 257, 179
Quercetin-3- <i>O</i> -pentose	1-3	29.7	434	433	271, 255, 300, 301	132	301	–
Quercetin-3- <i>O</i> -pentose	1-4	33.5	434	433	271, 300, 301, 255	132	301	–
Quercetin-3- <i>O</i> -pentose	1-5	35.2	434	433	301	132	301	151, 179, 257, 273
Quercetin-3- <i>O</i> -arabinofuranoside	1-6	38.6	434	433	271, 300, 301, 255, 179, 151	132	301	–
Quercetin-3- <i>O</i> -rhamnose	1-7	41.4	448	447	300, 271, 301, 255, 151	146	301	–
Kaempferol-3- <i>O</i> -arabinopyranoside	1-8	43.2	418	417	227, 255, 284, 285	132	285	–
Kaempferol-3- <i>O</i> -pentose	1-9	44.1	418	417	227, 284, 255, 285	132	285	–
Kaempferol-3- <i>O</i> -arabinofuranoside	1-10	46.7	418	417	284, 255, 227, 285	132	285	–
Kaempferol-3- <i>O</i> -rhamnose	1-11	47.8	432	431	284, 285, 255, 227	146	285	–
Quercetin	1-12	50.2	302	301	271, 255, 151	–	301	151, 179
Population 2								
Quercetin-3- <i>O</i> -galactoside	2-1	22.8	464	463	300, 301, 271, 255	162	301	–
Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside	2-2	25.7	464	463	271, 300, 301	162	301	–
Quercetin-3- <i>O</i> -pentose	2-3	30.1	434	433	300, 301	132	301	151, 179, 273, 229
Quercetin-3- <i>O</i> -glucuronide	2-4	32.8	478	477	301	176	301	151, 179, 229, 273
Quercetin-3- <i>O</i> -pentose	2-5	34.5	434	433	301, 300	132	301	151, 179, 273, 229
Quercetin-3- <i>O</i> -pentose	2-6	36.5	434	433	300, 301	132	301	151, 257, 179, 273
Quercetin-3- <i>O</i> -arabinofuranoside	2-7	41.7	434	433	300, 301, 271, 255	132	301	–
Quercetin-3- <i>O</i> -rhamnose	2-8	42.3	448	447	271, 300, 301, 255	146	301	–
Kaempferol-3- <i>O</i> -arabinopyranoside	2-9	43.3	418	417	227, 255, 284, 285	132	285	–
Kaempferol-3- <i>O</i> -glucuronide	2-10	43.9	462	461	285	176	285	285, 229, 257, 151
Kaempferol-3- <i>O</i> -pentose	2-11	44.2	418	417	285, 284	132	285	257, 229
Kaempferol-3- <i>O</i> -arabinofuranoside	2-12	46.8	418	417	255, 284, 285, 227	132	285	–
Kaempferol-3- <i>O</i> -rhamnose	2-13	47.0	432	431	285, 284, 255, 227	146	285	–
Quercetin	2-14	50.1	302	301	271, 255, 151	–	301	151, 179

<sup>a</sup> Listed by order of abundance.

<sup>b</sup> "Pseudo MS<sup>3</sup>" experiments on Y<sub>n</sub><sup>-</sup> ion (generated in source).

ing of a quaternary pump Lachrom 7100 and a DAD-UV Lachrom 7455 detector controlled by D-7000 HSM software (Merck). A Capital HPLC LTD (Broxburn, UK) C18 (150 mm × 10 mm, 5 μm) column was used as stationary phase at room temperature. The mobile phase and the gradient profile were the same as for analytical HPLC. The flow rate was 3 mL/min and monitoring was performed at 270 nm. Aliquots of 0.5 mL of concentrated fraction B of populations 2 and 1, respectively for 2–4 and 1–6 were applied per injection.

## 2.7. NMR experiments

NMR spectra were obtained at 25 °C on a Bruker Avance 500 operating at 500.13 MHz for <sup>1</sup>H and 125.75 MHz for <sup>13</sup>C (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany). Chemical shifts (δ) are given in ppm, and coupling constants (*J*) are reported in Hz. Samples were dissolved in deuterated methanol (CD<sub>3</sub>OD).

## 3. Results and discussion

### 3.1. HPLC profiles of the two populations

The two flavonoid fractions were analysed by HPLC/UV-DAD and a large number of flavonoid compounds was detected in both extracts (Fig. 2). A preliminary study of the UV spectra of the peaks gave a first indication of the family of phenolic compounds. UV spectra of all compounds (populations 1 and 2) showed characteristics of flavones derivatives with absorption bands at 254–256 and 345–355 nm and a shoulder at 290 nm [16]. HPLC chromatograms of the two populations at 260 nm were similar but not identical (Fig. 3). Indeed at least 12 peaks were detected at almost identical retention time for both population but two peaks (compounds

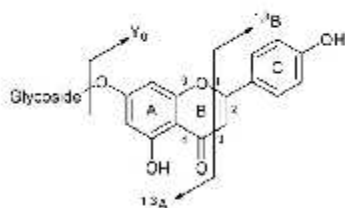


Fig. 1. Ion nomenclature followed for flavonoid glycosides (illustrated on a flavone aglycone) adapted from [11].

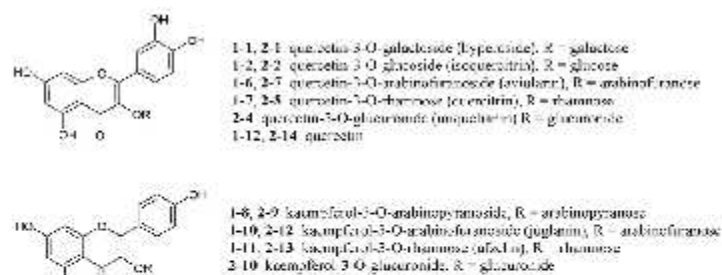
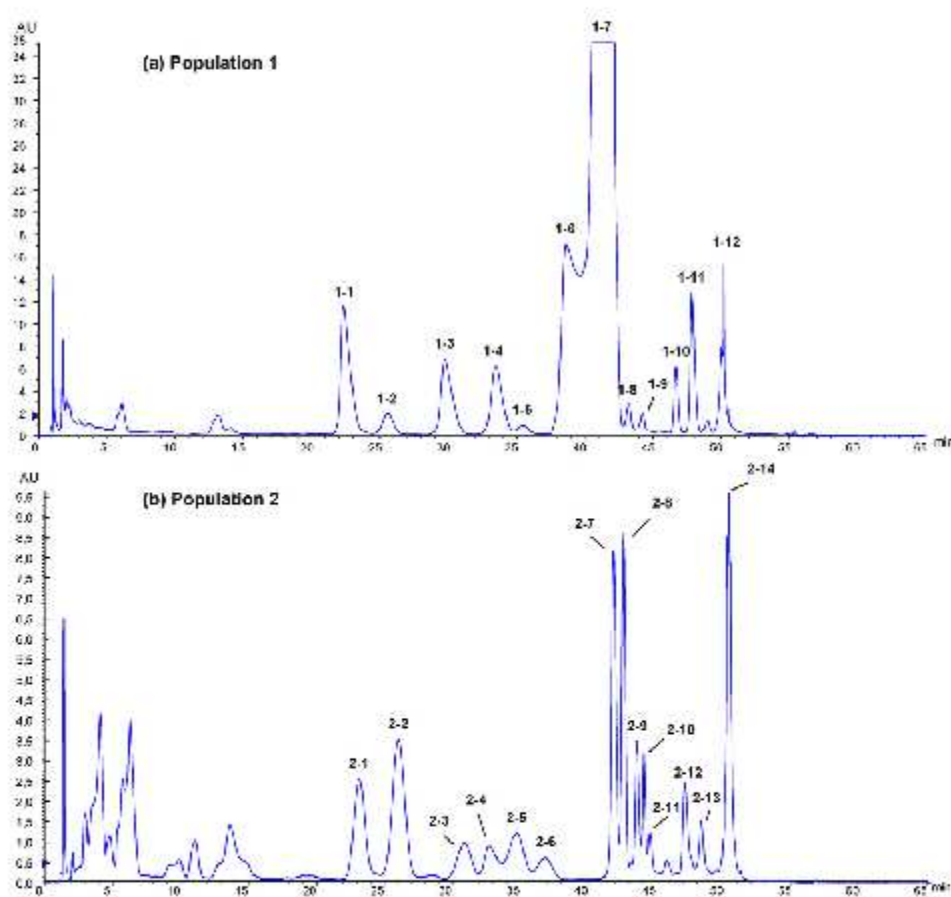
Fig. 2. Chemical structures of the flavonoid compounds isolated from the genus *Agave*.

Fig. 3. HPLC-UV chromatograms of the flavonoid extracts of (a) population 1 and (b) population 2, 260 nm.

2–4 and 2–10) were seen only for population 2 (Fig. 3b). Moreover, the areas of the peaks were also very different from one another.

### 3.2. Identification of the components of the extracts by LC-MS

Sample peaks (1–1 to 1–12 for population 1 and 2–1 to 2–14 for population 2) were compared with those of available reference compounds analysed under the same LC conditions in order to compare the UV and mass spectra, as well as the retention times. For compounds without available reference, full scan mode analyses followed by MS/MS experiments in negative ion mode appeared to be a powerful tool for their characterisation [17]. Table 1 presents the LC/MS data obtained for all peaks, including the retention times and MS/MS experiments. The kind of the attached glycosides was identified according to the losses of hexose, rhamnose, glucuronide and pentose moieties (–162, –146, –176 and –132 u, respectively) from the pseudo-molecular ions.

#### 3.2.1. Flavonol O-glycosides

The first-order spectra of the majority of compounds allowed us to identify their aglycone moieties. For all peaks, the radical aglycone  $[Y_0 - H]^-$  was formed in addition to the aglycone fragment  $Y_0^-$  indicating a 2,3 double-bond in the aglycone [18] confirming the presence of flavonoids of flavonol type. Furthermore, as described by Petsalo et al. [19] in case of the use of triple quadrupole mass spectrometer (ESI<sup>+</sup>), formation of intense radical fragment ions is due to homolytic glycan cleavages in position 3 whereas small or no radical fragment ion are observed

for 7-position glycosylation sites. As all molecules presented an intense radical fragment ion ( $m/z$  300 for quercetin and  $m/z$  284 for kaempferol aglycones), they were assumed to be glycosylated in position 3. Furthermore, the fragmentation pattern in negative ion mode (Table 1) of the molecules provided information needed to identify quercetin and kaempferol aglycones by comparison with standard compounds and with literature data [17]; the following fragment ions were observed for aglycones:  $Y_0^-$   $m/z$  301 or 285 (for quercetin and kaempferol, respectively),  $[Y_0 - H]^-$  at  $m/z$  300 or 284,  $[M - CH_2O]^-$  at  $m/z$  271 or 255,  $[M - H_2O - CO]^-$  at  $m/z$  255 (for quercetin) and the diagnostic ions  $^{1,3}A^-$  at  $m/z$  151 and  $^{1,2}A-H^-$  at  $m/z$  179 for quercetin.

Fig. 4 summarizes the different steps in the characterisation of quercetin-3-O-rhamnoside (1–7 or 2–8) as an example of the identification of flavonoid glycoside. First, the UV spectrum (Fig. 4B) gives information about the class of flavonoid compounds (peak 1–7 showed a UV spectrum typical of flavanone glycoside with absorption bands at 253 and 342 nm). Second, the first order mass spectrum in full scan mode (Fig. 4D) displayed a first approach to the compound structure, where the  $[M - H]^-$  ion corresponds to the deprotonated molecule at  $m/z$  447 and  $[Y_0 - H]^-$  is due to the loss of 146 u which indicated the presence of a rhamnose moiety. Finally, identification of the aglycone fragment ions compared with those described by Cuyckens et al. [17] allowed to conclude to the presence of quercetin aglycone and to identify compound 1–7 as quercitrin (quercetin-3-O-rhamnoside).

Flavonoid O-glycosides, such as quercetin-3-O-galactoside (1–1 and 2–1), quercetin-3-O-glucoside (1–2 and 2–2) were finally identified by comparison of their retention times (22.5 and 25.5 min, respectively) with those of reference substances

Table 2  
<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of compounds 1–6 (avicularin) and 2–4 (miquelianin) in CD<sub>3</sub>OD

Position	Quercetin-3-O- $\alpha$ -arabinofuranoside (1-6)		Quercetin-3-O- $\beta$ -glucuronopyranoside (2-4)	
	<sup>1</sup> H $\delta$ (multiplicity, J)	<sup>13</sup> C $\delta$	<sup>1</sup> H $\delta$ (multiplicity, J)	<sup>13</sup> C $\delta$
2	–	158.2	–	157.7
3	–	133.7	–	134.1
4	–	178.8	–	178.0
5	–	161.8	–	161.7
6	6.21 (d, 2.0)	98.9	6.42 (d, 2.0)	98.5
7	–	164.8	–	164.6
8	6.40 (d, 2.0)	93.5	6.23 (d, 2.0)	93.3
9	–	157.4	–	157.1
10	–	104.4	–	104.3
1'	–	121.9	–	121.5
2'	7.54 (d, 2.1)	115.7	7.72 (d, 1.9)	116.1
3'	–	145.1	–	148.5
4'	–	148.7	–	144.5
5'	6.92 (d, 8.3)	115.3	6.87 (d, 8.4)	114.7
6'	7.50 (dd, 2.1, 8.3)	121.8	7.60 (dd, 1.9, 8.4)	121.8
1''	5.48 (d, 1.0)	108.5	5.38 (d, 7.4)	102.9
2''	4.35 (dd, 1.0, 3.0)	82.1	3.56 m	74.0
3''	3.93 (dd, 3.0, 5.0)	77.5	3.50 m	76.4
4''	3.89 m	86.8	3.61 m	72.0
5''a	3.52 (dd, 4.5, 11.5)	61.4	3.78 m	76.4
5''b	3.48 (dd, 3.6, 11.5)	–	–	–
6	–	–	–	173.2

Please cite this article in press as: A. Lhuillier et al., J. Chromatogr. A (2007), doi:10.1016/j.chroma.2007.03.038



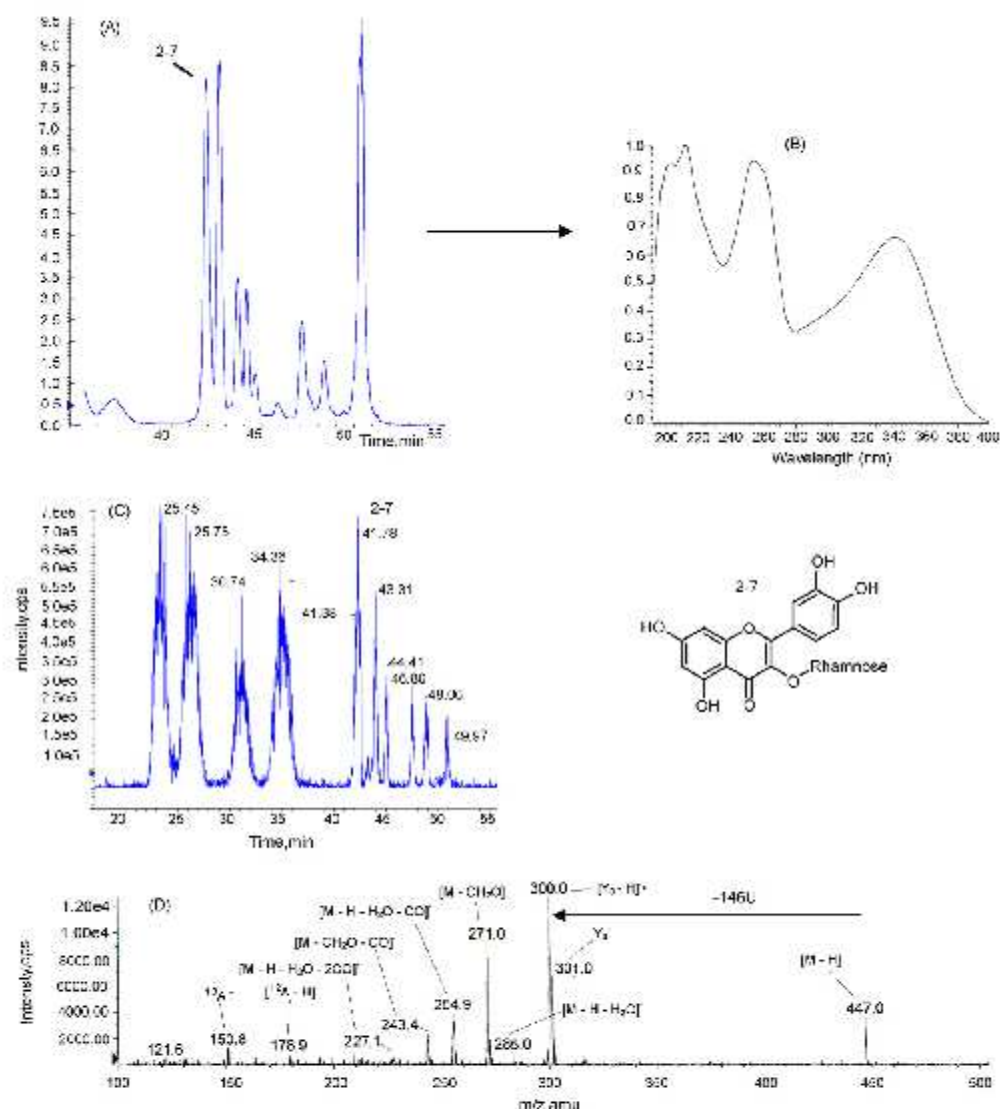


Fig. 4. Sequence of identification of quercetin-3-O-rhamnoside (quercitrin, 2-7): (A) UV chromatogram at 260 nm; (B) 200–400 nm UV spectrum of peak 2-7; (C) TIC chromatogram in precursor ion scan of 301 (before 43 min) and 285 (after 43 min) and (D) first-order MS spectrum of peak 2-7.

and also by loss of 162 u, which corresponds to the loss of a hexose unit under. Compounds 1-11 and 2-13 were tentatively identified as kaempferol-3-O-rhamnoside and 1-7 and 2-8 as quercetin-3-O-rhamnoside by neutral loss scan of 146 u and precursor ion scan of  $m/z$  285 and 301, respectively. Identification of these compounds was confirmed by comparison of the retention times with authentic standards. Compounds 1-8,

1-9, 1-10 and 2-9, 2-11, 2-12 showed characteristic fragmentation of kaempferol-3-O-pentose (pseudo-molecular ion of  $m/z$  417, neutral loss of 132 u and precursor ion scan of  $m/z$  285). 1-8 and 2-9 co-eluted with the reference substance kaempferol-3-O-arabinopyranoside and 1-10 and 2-12 co-eluted with the reference substance kaempferol-3-O-arabinofuranoside. Mass spectrometric characterisation of 1-3, 1-4, 1-5, 1-6 and 2-3,



2–5, 2–6, 2–7 provided evidence of the presence of isomers of quercetin-3-*O*-pentose ( $m/z$  433, neutral loss of 132 u and precursor ion scan of  $m/z$  301) but they could not be differentiated from each other.

To confirm the hypothesized structure from analytical investigations, compound 1–6 was isolated and identified by NMR. NMR measurements (see Table 2) were mainly used to confirm the aglycone unit and the glycosylation site in the aglycone. The  $^1\text{H}$  NMR data of 1–6 indicated a 5,7-dihydroxylated pattern for ring A (two meta-coupled doublets at  $\delta$  6.21 and 6.40,  $J=2.0$  Hz) and a 3',4'-dihydroxylation pattern for ring B [ABX system signals at  $\delta$  6.92 (d,  $J=8.3$  Hz), 7.50 (dd,  $J=8.3$ , 2.1 Hz), 7.54 (d,  $J=2.1$  Hz)], allowing the aglycone to be recognized as quercetin. Analysis of the chemical shifts, signal multiplicities, absolute values of the coupling constants, and their magnitude in the  $^1\text{H}$  NMR spectrum, as well as  $^{13}\text{C}$  NMR data (Table 2) indicated the presence of one arabinofuranosyl residue with  $\alpha$ -configuration at the anomeric carbon (doublet of  $J=1.0$  Hz at 5.48/108.5 ppm) [20]. The HMBC spectrum showed a correlation between the anomeric arabinose proton and quercetin carbon at the 3-position, giving the attachment site of the arabinose on quercetin and confirming mass hypotheses. 1–6 was identified as quercetin-3-*O*- $\alpha$ -arabinofuranoside (avicularin).

### 3.2.2. Flavonol *O*-glucuronides

Compounds 2–4 and 2–10 were tentatively identified as quercetin-3-*O*-glucuronide (miquelianin) and kaempferol-3-*O*-glucuronide by neutral loss scan of 176 u and after product ion scan of the aglycones (see Table 1). For these compounds with glucuronide moiety, the genins of flavonoids were identified using "pseudo MS<sup>3</sup>" experiments, in which in-source generated aglycone [M-H-glucose]<sup>+</sup> fragment ions ( $m/z$  285 and 301, respectively) that were chosen for further MS/MS experiments. The data from these experiments are shown in Table 1. Quercetin and kaempferol aglycones, respectively gave the characteristic ions due to a retro-Diels-Alder fragmentation described by Fabre et al. [21].

Owing to the lack of standards, compound 2–4 was isolated and eventually identified by NMR (confirmed by comparison with existing literature data [22]). Both the  $^1\text{H}$  and the  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic data of compound 2–4 exhibited a characteristic pattern of quercetin aglycone (Table 2) with a sugar attached at position 3. The anomeric signal ( $\delta$  5.38) appeared as a  $J=7.4$  Hz doublet, and taken along with the downfield shift of the carbon resonance ( $\delta$  102.9), indicated a  $\beta$ -configuration. The sugar moiety was completely elucidated as glucuronide thus allowing this compound to be identified as quercetin-3-*O*- $\beta$ -glucuronide.

## 4. Conclusion

From our results on the on-line analysis of *A. salicifolia* flavonoid extracts it is evident that there is a close similarity of flavonoid fractions of the two populations. LC–MS chromatograms of both extracts revealed similar profiles with two predominant flavonoids (compounds 1–6, 1–7 and 2–7, 2–8) with differences between the two populations especially in term of concentration of compounds. In this work,

LC/UV–DAD/ESI–MS/MS experiments on two populations of *A. salicifolia* led to the characterisation of 14 major flavonols *O*-glycoside constituents. Six flavonoids were conclusively identified by comparison of their  $R_f$ , their UV spectra and their ESI–MS/MS spectra with those of standards analysed under identical chromatographic conditions, namely quercetin, quercetin-3-*O*-galactoside, quercetin-3-*O*-glucoside, kaempferol-3-*O*-rhamnoside, kaempferol-3-*O*-arabinopyranoside and kaempferol-3-*O*-arabinofuranoside. The remaining compounds were tentatively identified by LC/UV–DAD/ESI–MS/MS as quercetin-3-*O*-rhamnoside, quercetin-3-*O*-arabinofuranoside, kaempferol-3-*O*-glucuronide and quercetin-3-*O*-glucuronide.

The chemical identification of quercetin-3-*O*- $\alpha$ -arabinofuranoside and quercetin-3-*O*- $\beta$ -glucuronide has been here ascertained by NMR experiments. All compounds were described for the first time in the genus *Agauria* but two of them (the glucuronide derivatives 2–4 and 2–10) were detected only in the population 2 thus pointing their interest as quality markers, whereas the rest were detected in both sample types. To complete this survey and in order to increase the speed and efficiency of the differentiation, direct loop injections of flavonoid extracts of the two populations were performed (data not shown). The peaks at  $m/z$  477 and 461 and the neutral loss of 176 u were only detected in population 2 confirming that glucuronide substituents are restricted to population 2 and could therefore be useful chemosystematic markers for this population. As in this case the direct loop injection is a sufficient method to distinguish the two samples, LC separation will not be necessary in further analysis.

The taxonomy of the genus *Agauria* is complicated both by the range of variability shown by *A. salicifolia* and the infraspecific taxa that have been described. The LC/UV–DAD/ESI–MS/MS technique developed here allowed pointing out chemical differences between two populations of *A. salicifolia* with morphological differences. These results may contribute to classification of authors such as Boiteau [1,2] who advocate the existence of several species and infraspecific taxa in the genus *Agauria* in Madagascar (e.g. *Agauria angustifolia*, *A. polyphylla*, *A. salicifolia* var. *salicifolia*) rather than classifications where this genus is reduced to *A. salicifolia*. However this study is only preliminary, further work is in progress to complete the results by the analysis of other samples of *A. salicifolia* originating from the same two populations to establish plausible variations in chemistry and valid the two flavonols-*O*-glucuronides as markers.

This study showed once again that characters based on the distribution of flavonoid compounds can be successfully used to resolve some taxonomic problems. Moreover, this survey confirmed that LC–ESI–MS<sup>n</sup> is a powerful tool for the screening and identification of flavonoid compounds in complex matrix.

## Acknowledgement

The authors wish to thank Bayer Consumer Care Division SERDEX (Pau, France) for financial support and for providing plant material.

## References

- [1] P. Boiteau, M. Nigeon-Dureuil, M. Rabinovitch, S. Raynaud-Jaques, C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. 249 (1959) 309.
- [2] I. Loriaux, P. Boiteau, H.P. Husson, *Phytochemistry* 12 (1973) 1500.
- [3] O. Martinet, P. Pommier, P. Schlossmacher, A. Develay, L. de Haro, *Presse Med.* 34 (2005) 797.
- [4] G. Ewane-Nyambi, P. Bois, G. Raymond, *J. Ethnopharmacol.* 38 (1993) 39.
- [5] J. Gregoire, L. Nyembo, *Phytochemistry* 16 (1977) 1609.
- [6] G. Ewane-Nyambi, P. Bois, G. Raymond, *J. Ethnopharmacol.* 38 (1993) 55.
- [7] G. Ewane-Nyambi, G. Raymond, *J. Ethnopharmacol.* 38 (1993) 49.
- [8] A. Sosa, J. Dussy, C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. 232 (1951) 2249.
- [9] K.E. Denford, in: W. Grant (Ed.), *Plant Biosystematics*, Academic Press, New York, 1984, p. 343.
- [10] M. Keinonen, R. Julkunen-Tiitto, *J. Chromatogr. A* 793 (1998) 370.
- [11] U. Justesen, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 369.
- [12] F. Vallejo, F.A. Tomas-Barberan, F. Ferreres, *J. Chromatogr. A* 1054 (2004) 181.
- [13] C. Saucier, M. Mirabel, F. Daviaud, A. Longieras, Y. Glories, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 5732.
- [14] H. Wagner, S. Bladt, *Plant Drug Analysis—A Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer, New York, 2001.
- [15] Y.-L. Ma, Q.M. Li, H. Van den Heuvel, M. Claeys, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11 (1997) 1357.
- [16] J.B. Harborne, *The Flavonoids*, Chapman & Hall, London, 1986.
- [17] E. Cuyckens, M. Claeys, *J. Mass Spectrom.* 39 (2004) 1.
- [18] E. Hvattum, D. Ekeberg, *J. Mass Spectrom.* 38 (2003) 43.
- [19] A. Petsalo, J. Jalonen, A. Tolonen, *J. Chromatogr. A* 1112 (2006) 224.
- [20] P.K. Agrawal, *Phytochemistry* 23 (1992) 3307.
- [21] N. Fabre, I. Rustan, E. de Hoffmann, J. Quetin-Leclercq, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12 (2001) 707.
- [22] I. Parejo, F. Viladomat, J. Bastida, G. Schmeda-Hirschmann, J. Burillo, C. Codina, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 1890.



## ANALYSIS OF FLAVONOID PROFILES OF AGAURIA SALICIFOLIA (ERICACEAE) BY LC-MS

Amélie Lhuillier<sup>a\*</sup>, Florian Moyano<sup>b</sup>, Nathalie Martins<sup>b</sup>, Catherine Claparols<sup>b</sup>, Nicolas Fabre<sup>a</sup> and Claude Moulis<sup>a</sup>

<sup>a</sup> UMR-152 Laboratoire de Pharmacochimie de Substances Naturelles et Pharmacophores Redox, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université Paul Sabatier, F-31062 Toulouse cedex 09, France

<sup>b</sup> Service Commun de Spectrométrie de Masse, Université Paul Sabatier, F-31062 Toulouse cedex 09

\*Corresponding author : lhuillie@cict.fr

### Introduction

Flavonoids are very common and wide spread secondary plant metabolites. They have a wide range of biological and physiological activities mainly based on their antioxidant properties [1]. The near ubiquitous distribution of flavonoids in green plants, their relative chemical stability and the strong tendency for related plants to produce similar types of flavonoids have made them particularly useful as taxonomic markers in plant classification. Flavonoids compounds have been used successfully as taxonomic markers to elucidate the organisation of genetic variability as well as the phylogenetic trends in several species complexes [2].

The present work investigates variation in flavonoid profiles obtained from individuals belonging to two population of an Ericaceae: *Agauria salicifolia* differing in their morphology. For this purpose, Liquid Chromatography/Mass Spectrometry coupling (LC/MS) was applied on flavonoid extracts of the two plants to obtain information on the aglycone moiety, the type of carbohydrate (mono- or disaccharide, hexose or pentose,...) or other substituents present for the structural characterisation of flavonoids [1, 3].

### Plant

*Agauria salicifolia* Hook.f. ex Oliver (Ericaceae) is an arborescent shrub common to forest countries of Madagascar, Mascareigne Islands and tropical Africa (Figure 1). Its leaves, very toxic for animal which eat them, are used by traditional practitioners against ulcerous wounds and to treat scabies. They contain several kinds of active principles such as diterpenoids (grayanotoxins) and triterpenoids [4]. Although many species and subspecies have been described in the genus *Agauria*, some authors are in favour of the existence of only one very polymorph species: *Agauria salicifolia* [5].



Figure 1. Trunk and roots (a), leaves (b) and flowers (c) of *Agauria salicifolia*.

### Experimental section

#### Plant material

The leaves of two different populations of *Agauria salicifolia* were collected in Madagascar in 2003 (respectively **population 1** and **population 2**). These populations, originating from contrasted ecogeographical situation, had strong morphological differences in particular in size and shape of leaves.

#### Specific Extraction of Flavonoids

A specific protocol of extraction and separation was developed to isolate flavonoids (Figure 2).

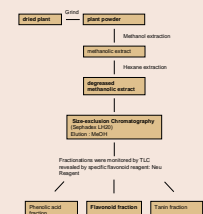


Figure 2. Specific extraction procedure for flavonoid fractions

#### Chromatographic conditions (HPLC)

Column SYMETRY C18 (Waters) 3.5  $\mu$ m (4.6 x 75 mm)

Time (min)	solvent composition (% acetonitrile) <sup>b</sup>
0	13
35	13
37	20
45	20
47	100
52	100

<sup>a</sup> 0.7 mL min<sup>-1</sup>.

<sup>b</sup> Gradient of acetic acid-water (0.1 % v/v) and acetonitrile

#### Mass Spectrometry

Peaks were analysed using a **API 365 PE Sciex triple quadrupole** mass spectrometer equipped with an **electrospray interface**.

Table 1. ESI-MS conditions<sup>a</sup>

DP	-80
FP	-310
CE	-30
Temperature	450 °C.

<sup>a</sup> Conditions were optimized by flow injection of standard solution.

### Results and discussion

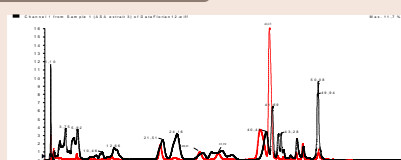


Figure 3. Compared HPLC chromatograms of flavonoid extracts of population 1 (in black) and population 2 (in red) 260 nm

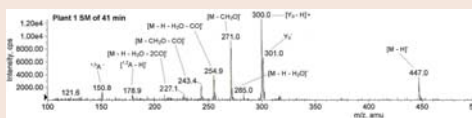


Figure 5. Example of fragmentation interpretation : first-order mass spectrum of the peak 41 min (population 2).

The first-order spectra of each compounds found on figure 4 allowed us to identify their aglycone moieties. The radical aglycone  $[Y_0 - H]^\bullet$  is formed in addition to the aglycone fragment  $Y_0$  indicating a 2,3 double-bond in the aglycone. Moreover, the fragmentation pattern in negative mode of the molecules provided information needed to identify quercetin and kaempferol aglycones by comparison with literature data (Table 3).

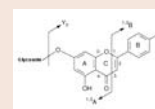


Figure 6. Ion nomenclature for flavonoid glycoside (illustrated on a flavone aglycone) adapted from [1].

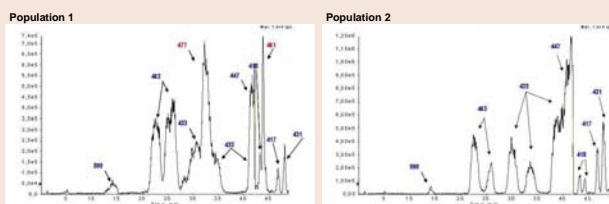


Figure 4 : Total ionic current of precursor ions of 301 and 285. Differences are labelled in red

### Conclusion et perspectives

The leaf flavonoid content in individual of *Agauria salicifolia* originating from population with contrasted ecogeographical situation and morphological characteristics is variable qualitatively and highly variable quantitatively. Two flavonoids out of thirteen / This substituent seem to be specific of the lot no. 1. This study points out chemical differences among a polymorphic species and this agrees with the hypothesis of the existence of several species. Until now, botanists were not able to conclude but it seems that the composition of flavonoid extracts is in favour of the presence of several species.

However mass spectrometry techniques used in this study cannot give complete information on these flavonoids. These results have to be completed by other analysis including MS/MS and MS/MS/SM to bring structural information and confirm or not the existence of two distinct species.

### References

- [1] Cuyckens, F. and Claeys, M. (2004) Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39 (4) 1-15.
- [2] Denford, K.E. (1984) Phytochemical approaches to bioassays, in: Grant, W. (Ed.) *Plant bioassays*, pp. 343-358 (New York, Academic Press).
- [3] Fabre, N., Rustin, L., de Hoffmann, E. and Quenin-Lacour, J. (2004) Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray on trap mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15 (6) 707-715.
- [4] Gregoire, J. and Nyembo, L. (1977) Triterpenoids from *Agauria salicifolia*. *Phytochemistry*, 16 (10) 1609-1610.
- [5] Loriaux, L., Bouteau, P. and Hussen, H.P. (1973) Isolation of grayanotoxins from leaves of *Agauria polyphylla*. *Phytochemistry*, 12 (8) 1500.

### Acknowledgment

The authors wish to thank Bayer Consumer Care Division SERDEX (Pau, France) for financial support and for providing plant material.



## ***Lexique de botanique***

**Actinomorphe** : qualifie une fleur régulière à symétrie axiale.

**Akène** : fruit sec, indéhiscent, dont la capsule contient une graine unique non soudée avec le péricarpe.

**Cladistique** : méthode de classification qui établit des relations de parenté phylogénétiques entre taxons lorsqu'ils possèdent les mêmes caractères dérivés ou synapomorphies ; elle vise à mettre en évidence la séquence évolutive de leurs transformations, c'est-à-dire déterminer leur état primitif et leur(s) état(s) dérivés.

**Drupe** : fruit charnu indéhiscent caractérisé par son endocarpe lignifié.

**Epiphyte** : qualifie des espèces de végétaux qui vivent sur les troncs, les branches, les feuilles d'un autre végétal.

**Isostémone** : qualifie un androcée dont le nombre d'étamine est égal à celui des pétales ou des sépales.

**Laticifères** : qui contiennent du latex

**Monophylétique** : qualifie un ensemble d'unités taxonomiques ayant un seul ancêtre commun ; une telle lignée est considérée comme naturelle.

**Mycorhize** : association symbiotique entre le mycélium d'un champignon et les racines d'une plante

**Obdiplostémone** : qualifie un androcée dont le nombre d'étamines disposé sur deux verticilles est double de celui des pétales ou des sépales et dont le verticille externe est opposé aux pétales.

**Pachycaule** : plante dont la tige est succulente sur toute sa longueur et non pas particulièrement à sa base.

**Périanthe** : ensemble des enveloppes florales protégeant les organes reproducteurs et constituant la partie asexuée de la fleur.

**Péricarpe** : enveloppe du fruit, provenant du développement des parois du carpelle.

**Phylogénie** : étude de la formation et de l'évolution des organismes en vue d'établir leur parenté

**Polyphylétique** : qualifie une lignée artificielle ayant plus d'une origine évolutive.

**Sempervirent** : qualifie les végétaux ligneux qui conservent un feuillage vert toute l'année.

**Tomenteux** : qualifie une plante ou une partie de plante recouverte de poils épais, courts et mous, d'une pubescence cotonneuse, entrecroisée, feutrée.



**Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (*Ericaceae*), *Tambourissa trichophylla* Baker (*Monimiaceae*) et *Embelia concinna* Baker (*Myrsinaceae*).**

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique de quatre plantes : deux *Ericaceae*, *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver et *Agauria polyphylla* Baker, une *Monimiaceae*, *Tambourissa trichophylla* Baker et une *Myrsinaceae*, *Embelia concinna* Baker sélectionnées pour leur utilisation en médecine traditionnelle malgache. Trois flavonoïdes et un triterpène ont été isolés des deux espèces de *Agauria*. Trois flavonols ont été isolés des feuilles de *T. trichophylla*. Dix composés ont été identifiés de *E. concinna* : un triterpène, six flavonols, un acide phénolique, ainsi qu'un alkyle résorcinol et un acide gras. Les structures des composés ont été élucidées par l'utilisation de techniques de RMN 1D et 2D et par spectrométrie de masse. La comparaison par spectrométrie de masse des fractions flavonoïdiques de *A. salicifolia* et *A. polyphylla* a permis d'identifier neuf composés supplémentaires. Deux composés sont spécifiques de *A. salicifolia* et permettent de distinguer chimiquement les deux espèces.

**Mots-clés : Phytochimie - Flavonoïdes - Spectrométrie de masse - *Agauria salicifolia* - *Agauria polyphylla* - *Tambourissa trichophylla* - *Embelia concinna*.**

---

**Contribution to the phytochemical study of four plants of Madagascar: : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (*Ericaceae*), *Tambourissa trichophylla* Baker (*Monimiaceae*) et *Embelia concinna* Baker (*Myrsinaceae*).**

This report contributes to complete the phytochemical knowledge on four plants: *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (*Ericaceae*), *Tambourissa trichophylla* Baker (*Monimiaceae*) and, *Embelia concinna* Baker (*Myrsinaceae*) used in traditional medicine in Madagascar. Four compounds were isolated from the extracts of the *Agauria*: a flavonoid type compound and a triterpene. Three flavonol O-glycosides were isolated from *T. trichophylla* extracts. The study of *E. concinna* led to the isolation and characterization of a triterpene, six flavonoïdes, a phenolic acid, a fatty acid and an alkylresorcinol. The use of these compounds as phytochemical markers was evaluated. Identification of the compounds was carried out by interpretation of MS, MS/MS, 1D and 2D NMR spectra. Liquid chromatography coupled mass spectrometry was used to compare the flavonoid fractions of *A. salicifolia* and *A. polyphylla*. Two flavonol O-glucuronides were found to differentiate the two populations.

---

Laboratoire Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox

UMR 152 IRD - UPS

Faculté des Sciences Pharmaceutiques - Université Paul Sabatier - Toulouse III

31062 TOULOUSE cedex 09 - France